

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN
ZUR NICHT-PARENTERALEN VAKZINIERUNG
VON WEISSEN MÄUSEN GEGEN INFEKTIÖSE
EKTROMELIE UNTER BESONDERER
BERÜCKSICHTIGUNG DER AEROSOL-METHODE

Wolfdieter Zschekel

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553810_0062

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. J. Boch

Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. E. Munz

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR NICHT-PARENTERALEN
VAKZINIERUNG VON WEISSEN MÄUSEN GEGEN INFEKTIÖSE
EKTROMELIE UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER
AEROSOL-METHODE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereiches Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Wolfdieter Zschekel
aus Stuttgart
München 1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. E. Munz
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. H.G. Buschmann

Tag der Promotion: 27. Februar 1976



Inhaltserzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	3
2. <u>Schrifttum</u>	5
2.1. Begriffsbestimmung	5
2.2. Wirtsspektrum, Verbreitung und Bedeutung der Mäusepocken	5
2.3. Erreger der infektiösen Ektromelie	6
2.4. Viruszüchtung	8
2.4.1. Viruszüchtung im embryonierten Hühnerei	8
2.4.2. Viruszüchtung in Zellkulturen	9
2.5. Pathogenese	10
2.5.1. Klinik und Pathologie der infektiösen Ektromelie	10
2.5.1.1. Die latente Form	11
2.5.1.2. Klinisch inapparente (subklinische) Form	11
2.5.1.3. Die akute Form	12
2.5.1.4. Subakute bis chronische Form	12
2.5.2.1. Pathologisch anatomische Veränderungen	13
2.5.2.2. Histologische Veränderungen	14
2.6. Natürliche und artifizielle Infektionsmöglichkeiten	15
2.7. Diagnostik	17
2.8. Immunität bei Mäusepocken	19
2.9. Bekämpfung und Prophylaxe	21
3. <u>Grundsätzliches zur Immunisierung gegen Mäusepocken</u>	22
3.1. Impfstoffe	22
3.2. Impfmethoden	23
4. <u>Aerosol- bzw. nasale Immunisierungsversuche bei Pockeninfektionen</u>	25
5. <u>Eigene Untersuchungen</u>	27

5.1.	Material und Methoden	27
5.1.1.	Abkürzungen	27
5.1.2.	Medien	28
5.1.3.	Zellkulturen	28
5.1.4.	Virusstämme	30
5.1.4.1.	Impfstämme	30
5.1.4.2.	Challenge-Virus	31
5.1.5.	Viruszüchtung	31
5.1.6.	Virustitrationen	33
5.1.6.1.	KID ₅₀ -Bestimmung	33
5.1.6.2.	LD ₅₀ -Bestimmung	34
5.1.7.	Versuche zum Virusnachweis nach Aerosol-Applikation von Vaccinia- und Ektromelie-Virus	34
5.1.8.	Versuchstiere und Versuchsbedingungen	35
5.1.9.	Immunisierungs- und Infektions- methoden	36
5.1.10.	Unschädlichkeitsprüfung	40
5.1.11.	Serumgewinnung	40
5.1.12.	Hämagglutinationshemmungstest	40
5.1.13.	Versuchsanordnung	41
5.2.	Versuchsergebnisse	45
5.2.1.	Erprobung des Aerosolgerätes	45
5.2.2.	Unschädlichkeitsprüfung der applizierten Impfstoffe	45
5.2.3.	Ergänzende Versuche über den Einfluß der Applikationsart von virulentem Ektromelie-Virus auf den Infektions- verlauf	46
5.2.4.	Ergebnisse des 1.Vorversuches	47
5.2.5.	Ergebnisse des 2.Vorversuches	52
5.2.6.	Ergebnisse des Hauptversuches	53
6.	<u>Besprechung der Ergebnisse</u>	59
7.	Zusammenfassung und Summary	66
8.	Literaturverzeichnis	69
9.	Lebenslauf	79

1. Einleitung

Die bei Mäusen auftretende Pockenerkrankung, auch infektiöse Ektromelie genannt, bedeutet besonders für Versuchstierzüchter und die experimentelle Versuchstierhaltung, wo große Mäusepopulationen auf kleinem Raum gehalten werden, ein erhebliches Risiko. Noch nachteiliger wirkt sich aber oft die latente Ektromelieinfektion aus. Durch Streßsituationen, wie schlechte Versandbedingungen, künstliche Infektionen, Toxizitätsversuche usw. können diese subklinischen Verlaufsformen jederzeit in eine klinisch apparente Erkrankung übergehen. Bei infizierten Versuchstieren kann es so zu Fehleinschätzungen von Testergebnissen kommen.

Der Erreger dieser Krankheit ist ein originäres Tierpockenvirus, das Mäusepockenvirus. Es hat ein enges Wirtsspektrum, das sich streng auf Wild- und Labormäuse beschränkt. Wenn auch bei einigen Labormäusestämmen eine angeblich unterschiedliche Resistenz gegen die Infektion zu beobachten ist, so wendet man doch seit Jahren als Prophylaktikum die Vakzinierung der Bestände mit Vacciniavirus, ein dem Mäusepockenvirus immunologisch verwandter Erreger, an. Das Vacciniavirus wird dabei in der Regel intraperitoneal oder kutan appliziert. Beide Verfahren erfordern in großen Beständen einen hohen Arbeitsaufwand. Deshalb wird in jüngster Vergangenheit nach weniger aufwendigen Verfahren geforscht. Im Vordergrund der Bemühungen stehen dabei nicht-parenterale Immunisierungsmethoden.

Dabei werden die Impfstoffe vorwiegend oral - über das Trinkwasser - oder als Aerosol erfolgreich verabreicht, so daß derartige Vakzinierungsmethoden immer mehr gegen Krankheiten viraler- und bakterieller Genese propagiert werden.

Aufgabe vorliegender Arbeit ist es, zur Problematik der Vakzinierung gegen Mäusepocken einen Beitrag zu liefern. Es sollte getestet werden, ob ein ausreichender Impfschutz gegen Mäusepocken mit einem Aerosol (Spray-Vakzinierung) auf der Grundlage eines Vacciniavirus oder eines attenuierten homologen Mäusepockenvirus erreicht werden kann.

2. Schrifttum

2.1. Begriffsbestimmung

Erstmals beschrieb MARCHAL (1930) die Mäusepocken als hoch kontagiöse und verlustreiche Infektionskrankheit. Er bezeichnete sie als "infektiöse Ektromelie", um damit auf ein charakteristisches Sympton hinzuweisen, das mit der Amputation der Gliedmaßen und des Schwanzes einher geht. Diese Form der Erkrankung ist jedoch relativ selten, häufiger kommt es zu septikämischen oder latenten Krankheitsverläufen.

Die Krankheit wird durch ein spezifisches Mäusepockenvirus, das den Orthopoxviren zugerechnet wird, verursacht (vgl. 2.3.).

2.2. Wirtsspektrum, Verbreitung und Bedeutung der Mäusepocken

Das Wirtsspektrum des Ektromelievirus beschränkt sich auf Wild- und Labormäuse. Letztere sind besonders gefährdet, während Wildmäuse anscheinend das natürliche Virusreservoir bilden (GRÖPPEL 1962). Es sind aber auch einige Mäusestämme bekannt, die sich durch eine genotypisch bedingte Resistenz gegenüber Mäusepocken auszeichnen (SCHELL 1960). Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen oder Affen sind selbst gegen hohe Virusdosen nicht empfänglich. Auch für den Menschen ist das Virus angeblich apathogen (MOSER 1943).

Die Mäusepocken sind eine weltweit verbreitete

Seuche; Autoren aus verschiedenen Ländern Europas (RÖHRER 1967) und Amerikas (TRENTIN und BRIODY 1953) berichten darüber. Insbesondere dort, wo große Tierkollektive gehalten werden, also in Versuchstierzuchten und dergleichen, können verheerende Ausfälle auftreten. Sie werden nicht allein durch die hohe Kontagiosität und Mortalität bei akutem Krankheitsverlauf bedingt, schwerwiegender noch wirken sich die Verluste durch die latente, beziehungsweise klinisch inapparente Ektromelieinfektion bei tierexperimentellen Untersuchungen aus. Durch Stressituationen, wie schlechte Versandbedingungen, künstliche Infektionen, Toxizitätsversuche usw. kann sich die subklinische Verlaufsform jederzeit zu einer klinisch manifesten Erkrankung aktivieren. Nicht erkennbar infizierte Versuchstiere können so zu Fehleinschätzungen von Testergebnissen führen und scheiden daher als Labortiere aus.

2.3. Erreger der infektiösen Ektromelie

Das Mäusepockenvirus oder Ektromelievirus wird unter dem Namen Orthopoxvirus muris innerhalb der Familie Poxviridae zum Genus der Orthopoxviren gezählt. Seine Morphologie wie seine chemisch-physikalischen Eigenschaften gleichen weitgehend denen der anderen Pockenviren dieses Genus (MAYR et al. 1972). Auch das Mäusepockenvirus hat eine quaderförmige Gestalt von 360 nm Länge und 240 nm Breite. Als Strukturelemente besitzt es eine äußere Hülle (Doppelmembran mit Filamenten),

zwei Lateralkörper, ein Oberflächenprotein und einen Innenkörper mit Nukleoidmembran, in dem die DNS gelagert ist. Die wichtigsten physikalisch-chemischen Eigenschaften sind seine Empfindlichkeit gegen Fettlösungsmittel und seine spezifische Dichte von 1,287 g/ml (SCHIEK 1966).

Auch die serologisch-immunologischen wie die biologischen Eigenschaften zeigen eine enge Verwandtschaft zu den übrigen Vertretern der Vaccinia-Variola-Gruppe. So schützt z.B. eine Infektion mit dem für erwachsene Mäuse wenig virulenten Vacciniavirus gegen eine Reinfektion mit Mäusepockenvirus (ZELLER und RECKZEH 1965a); hierauf basiert die prophylaktische heterologe Schutzimpfung mit Vacciniavirus gegen Mäusepocken (ZELLER und RECKZEH 1965a+b). Dies kann unter Umständen die serologische Differentialdiagnose durch Antikörpernachweise zwischen Infektions- und Impftitern erschweren (KARASEK 1969).

Das Mäusepockenvirus induziert im Organismus die Bildung virusneutralisierender, komplementbindender, hämagglutinationshemmender und präzipitierender Antikörper. Die beiden letzteren haben beim Nachweis der Ektromelie-Infektion praktische Bedeutung (HORZINEK 1965a+c, ROHDE und KARASEK 1970). Die Bildung hämagglutinationshemmender Antikörper scheint dabei nicht von bestehenden Virulenzunterschieden verschiedener Virusstämme abhängig zu sein. Im Gegensatz zu den anderen Viren der Variola-Vaccinia-Gruppe werden vom Mäusepockenvirus nicht nur Hühner- sondern auch Mäuseerythrozyten agglutiniert.

Das Mäusepockenvirus bewirkt in befallenen Zellen

spezifische intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen vom Typ A, die sogenannten Marchalschen beziehungsweise Birch-Hirschfeldschen Einschlusskörperchen. Es sind dies eosinophile, unterschiedlich große, granulierten Einschlüsse, die meist von einem hellen Hof umgeben sind. Sie finden sich in Zellen verschiedener Organe wie Leber, Pankreas (SOAVE und LUND 1970) und besonders in der Epidermis (RÖHRER 1967). Diese feulgennegativen Einschlüsse stellen eine sekundäre, nicht aus virusspezifischem Material bestehende Zellreaktion dar. Von ihnen sind die zytoplasmatischen Zelleinschlüsse vom Typ B' zu unterscheiden, die bei allen Pockeninfektionen beobachtet werden und als Orte der Virusvermehrung gelten (ZELLER u. RECKZEH 1965a)

2.4. Viruszüchtung

2.4.1. Viruszüchtung im embryonierten Hühnerei

Ein besonders gut einsetzbares, nicht homologes Wirtssystem für das Mäusepockenvirus ist das bebrütete Hühnerei. Dies zeigen bereits Untersuchungen von BURNET und LUSH (1936). Weitergehende Arbeiten lieferten HERRLICH und MAYR (1955), indem sie die Kriterien zur Differenzierung von Pockenviren im bebrüteten Hühnerei beschrieben. Auf der Chorionallantoismembran entwickeln sich 3 bis 4 Tage p.i. bei einer Temperatur von 35° C typische kleine proliferierende Herde, die sich zu bestimmten Zeiten p.i. von den Veränderungen anderer Viren unterscheiden lassen, die ebenfalls auf der CAM charakteristische Läsionen verursachen. Unter bestimmten Voraussetzungen kommt es zur Virusaussaat im gesamten Embryo samt seiner Anhangsorgane (LAWRENCE 1955).

Die Virusausbeute der beimpten Chorioallantois-membran ist recht ergiebig und übertrifft die anderer Verfahren der Virusgewinnung aus dem Brutei.

2.4.2.

Als ein weiteres Verfahren, das Mäusepockenvirus mit hoher Virusausbeute unter Laborbedingungen zu züchten, bieten sich Zellkulturen homologer und heterologer Herkunft an. Das in vitro Wirtsspektrum ist dabei größer als das in vivo. Erste Untersuchungen hierüber stellte BIRCH-HIRSCHFELD (1933) mit Milz- und Hodengewebekulturen von Kaninchen an. Von DOWNIE und MC GAUGHEY (1935) liegen Berichte vor, nach denen sie Ektromelievirus in Gewebekulturen embryonaler Mäuse, Nieren adulter Mäuse und Hühnerembryonen anzüchteten. Weitere Arbeiten befaßten sich mit der Züchtung von Ektromelievirus in HeLa Zellen (BARSKI 1960), in embryonalen Rindermuskelzellen, auf Kaninchenkorneaepithelien, sowie in Rattengewebe (HERRLICH 1967). Eine optimale Virusvermehrung bieten primäre Hühnerembryo-Fibroblastenkulturen.

Die Virusvermehrung ist in Zellkulturen von einem zytopathischen Effekt begleitet. Er äußert sich nach DIFENTHAL und HABERMEHL (1959) bei primären embryonalen Mäusefibroblasten-Kulturen nach einer mindestens 16-stündigen Bebrütungszeit bei 35° C als trau-bige Quellung der Zellen, in denen eosinophile zytoplasmatische Einschlußkörperchen nachweisbar sind und in Riesenzellbildung (KARASEK und ROHDE 1969). Bei geringer Viruskonzentration bilden sich nach der Quellung und Lysis infizierter Zellen "plaque"-ähnliche Defekte im Zellrasen aus. In Hühnerfibroblastenkulturen läuft die Virusvermehrung morpholo-

gisch gleichartig ab.

2.5. Pathogenese

Die bei der Ektromelie ablaufende pathogenetische Ereigniskette hat man besonders bei der akuten Verlaufsform der Krankheit untersucht. Sie veranlaßte FENNER (1949c) bei der infektiösen Ektromelie von einer zyklischen Infektionskrankheit zu sprechen. Nach Haftung des Virus an der oral, nasal oder kutan gelegenen Eintrittspforte kommt es zu einer lokalen Erregervermehrung im infizierten Gewebe und in den zugehörigen Lymphknoten. Aus diesem Primärkomplex gelangt Virus ins Blut (primäre Virämie). Sogenannte "primär affine" Organe, wie Leber und Milz filtern das Virus ab. Es vermehrt sich in diesen Organen sehr stark, bis es über die generalisierende oder sekundäre Virämie dann zur Organmanifestation mit entsprechenden Folgen kommt. Bei den anderen Verlaufsformen der Ektromelie müssen noch andere, nur teilweise bekannte Reaktionsweisen ablaufen, wobei wahrscheinlich auch allergische Vorgänge eine Rolle spielen dürften (MATSUBARA 1959).

2.5.1. Klinik und Pathologie der infektiösen Ektromelie

Abhängig von der Empfänglichkeit der betroffenen Mäusepopulation und deren Immunstatus, der Virulenz und Menge des infizierenden Erregers beschrieb BRIODY (1955) 6 Verlaufsformen. Neuerdings unterscheidet man nur noch 4 Krankheitsbilder, weil die Erkrankung der frisch abgesetzten Mäuse und die der alten Tiere, die BRIODY gesondert aufführte, zur aku-

ten bzw. zur chronischen Form gezählt wird (MUNZ, persönliche Mitteilung)

2.5.1.1. Die latente Form

Bei ihr lassen sich weder klinisch noch immunologisch meßbare Reaktionen erkennen. Sie hat große Bedeutung in der Epidemiologie der Seuche, da diese äußerlich für gesund erscheinenden Tiere Virusträger sind, die den Erreger über den Kot ausscheiden, aber auch durch Biß und Kratzverletzungen verbreiten. Latente Verlaufsformen sind besonders bei Wildmäusen anzutreffen (ROLLE und MAYR 1966). Auf eine vertikale Virusübertragung weisen GERMER et al. (1961) hin, sie wird als latente Infektion der Embryonen infizierter Muttertiere interpretiert.

2.5.1.2. Klinisch inapparente (subklinische) Form

Hier fehlen ebenfalls klinische Symptome, doch kommt es zu einer immunologischen Reaktion des infizierten Tieres. Auch diese Verlaufsform bedeutet für die Mäusezuchten ein besonderes Risiko, da sie sich ebenfalls durch resistenzmindernde Faktoren zu einer akuten Erkrankung aktivieren läßt. GLEDHILL (1962) hat dieses Krankheitsgeschehen durch orale Verabreichung geringer Virusdosen per Magensonde erzeugt. Die Tiere beherbergten den Erreger lange im Intestinaltrakt und schieden ihn mit dem Kot, aber auch über die Haut aus. Auf diese Art soll eine Übertragung des Erregers von Generation zu Generation erfolgen.

HORZINEK und HÖPKEN (1965b) bewirkten durch eine ähnliche Versuchsanordnung, die ebenfalls eine inapparente Infektion zur Folge hatte, daß derart per os infi-

zierte Mäuse dann eine Belastungsinfektion von 10^6LD_{50} -Einheiten überlebten, wenn sie enteral mehr als 10^3LD_{50} -Einheiten erhalten hatten. Vieles spricht dafür, daß es nach peroraler Aufnahme geringer Virusmengen fast immer zu einer inapparenten Infektion kommt.

2.5.1.3. Die akute Form

Bei der akuten Verlaufsform kommt es ab dem 6. Tag p.i. zu plötzlichen Todesfällen, bedingt durch starke Exsudatansammlungen in Brust- und Bauchhöhle oder durch multiple Nekrosen in Leber und Milz (FENNER 1949b), ohne daß vorher äußerlich erkennbare Symptome bemerkt werden. Dieser mit einer hohen Letalität einhergehende Krankheitsverlauf trifft besonders Mäuse kurz nach dem Absetzen und voll empfängliche Tiere. Nach i.p. Infektion wird ebenfalls häufig diese Verlaufsform beobachtet. Nach BLANDEN (1971) ist dabei für das Überstehen der Krankheit von besonderer Bedeutung, wie stark die Veränderungen in der Leber sind.

2.5.1.4. Subakute- bis chronische Form

Kommt es zu einer verzögerten Virusvermehrung (schwach virulente Erregerstämme - immunologische Abwehrmechanismen), so entstehen die typischen Symptome der Ektromelie: Ödematisierung des Kopfes (man spricht von "Mumpsgesicht"), ja sogar des ganzen Körpers, verbunden mit Konjunktivitis und Blepharitis. Besonders auffällig sind die Schwellungen der Extremitäten oder des Schwanzes mit Nekrosen und Ulzerationen.

Schließlich treten Einschnürungen an der Schwanzwurzel und an den Extremitäten mit folgender Demarkation und Amputation auf. Dabei können der Schwanz, einzelne Zehen oder die ganze Extremität verloren gehen. Die Mortalität ist relativ gering. Ein großer Teil solcher Tiere erholt sich erstaunlicherweise völlig nach Abheilung der Restgliedmaßen (RÖHRER 1967). Man beobachtet dieses Bild vorwiegend bei älteren Tieren, sie weisen gegen eventuelle spätere Reinfektionen eine gute Immunität auf.

2.5.2.1. Pathologisch anatomische Veränderungen

Die pathologisch anatomischen Veränderungen werden maßgeblich von der jeweils vorliegenden Verlaufsform bestimmt (BIRCH-HIRSCHFELD 1933; FENNER 1948a, 1949; MARCHAL 1930). So fallen bei der akuten Verlaufsform besonders die umfangreichen Exsudatansammlungen in Brust- und Bauchhöhle auf. Die Leber ist vergrößert, feucht, von schmutzig grauer Farbe und weicher Konsistenz. Bisweilen lassen sich kleine Blutungen finden (RÖHRER 1967). Bei der subakuten bis chronischen Form kommt es dagegen zu herdförmigen kleinen Nekrosen, die über die Leber verstreut sind. Die Milz ist hyperplastisch, unter ihrer Kapsel lassen sich ebenfalls vereinzelte kleine Nekroseherde erkennen (RÖHRER 1967). Auch die regionären Lymphknoten eines Infektionsherdes sind hyperplastisch verändert, sie fallen durch eine grauweiße, zuweilen glasige Schnittfläche auf.

Die bei chronischen Krankheitsverläufen auftretenden,

teilweise bis zur Subkutis reichenden Hautläsionen stellen sich als zunächst ödematös, papulös herdförmige Alterationen dar, die in späteren Stadien in Ulzera und Nekrosen übergehen. Diese Partien können abgestoßen werden. Manchmal führen die ulzerativen Prozesse über Gangränbildung mit anschließender Demarkierung zur Amputation von Extremitäten. Nach MATSURBA (1959) wirken dabei allergische Vorgänge mit.

2.5.2.2. Histologische Veränderungen

In der Milz sieht man mikroskopisch nach GÜTTNER (1974) "häufig Follikelhyperplasie mit unspezifischen kerntrümmerphagozytierenden Retikulumzellen. Letztere sind fast pathognomonisch für eine subklinisch verlaufende Ektromelie, wenn sie in kleinen Gruppen, meist exzentrisch liegen." Im Zytoplasma der Retikulumzellen sind Marchalsche Einschlusskörperchen nachweisbar. Die Lymphknoten weisen ähnliche Veränderungen auf, die sich hier als unspezifische chronische Lymphadenitis darstellen. In der Leber kommt es besonders nach akuter Erkrankung zu multiplen, disseminierten und unterschiedlich großen, teils hyalinisierten Koagulationsnekrosen mit folgender Granulombildung.

Nach RÖHRER (1967) treten in der Leber bei akuten Fällen neben Blutaustritten nekrobiotische Herde unterschiedlicher Ausdehnung auf, die ohne bevorzugte Lokalisation bezüglich der Läppchenstruktur die Tendenz haben, zu konfluieren.

Nach KIKUTH und GÖNNERT (1940) treten bei intranasal infizierten Mäusen in den Zellen der respiratorischen Schleimhaut zahlreiche zytoplasmatische Einschlußkörperchen auf. Bei i.p. und s.c. Infektion von Mäusen mit Ektromelie-Virus sollen nach ORLAND (1970) am 4. Tag p.i. Einschlußkörperchen in der Leber, im Pankreas und im Darmepithel nachweisbar sein, ebenso nach dem 7. Tag p.i. in den Epithelzellen der Haut.

Insgesamt sind, werden keine Einschlußkörperchen nachgewiesen, besonders bei der einer oralen Infektion folgenden akuten bis chronischen Verlaufsform die Veränderungen als unspezifisch einzuschätzen. (Sie sind morphologisch von subakutem bis subchronischem Charakter, fehlen aber bei der perakuten Verlaufsform, GÜTTNER (1974)).

Die besonders bei chronischen Krankheitsbildern zu beobachtenden Hautnekrosen zeigen lympho- und leukozytäre Infiltrationen mit Kernpyknose und karyolysierenden Vorgängen bei der Sequesterbildung (RÖHRER 1967).

2.6. Natürliche und artifizielle Infektionsmöglichkeiten

Die natürliche Infektion mit Ektromelie-Virus soll nach FENNER (1947a) über kleine Hautläsionen, insbesondere nach Biß- und Kratzverletzungen erfolgen. Männliche Tiere werden häufiger von der Krankheit befallen, da sie öfter in Raufereien verwickelt sind, bei denen sie sich solche Läsionen zuziehen. Andererseits schließt BRIODY (1959) aus Infektions-

versuchen, daß die aerogene Übertragung über den Respirationstrakt der natürliche Infektionsweg sei. Die orale Aufnahme des Erregers gilt ebenfalls als natürlicher Infektionsmodus (HORZINEK und HÖPKEN 1955), gefördert durch Kannibalismus und Putzhandlungen. GERMER et al. (1961) und SCHWANZER (1975) berichten über die intrauterine Infektion von Embryonen.

Die Virusausscheidung durch latent und akut erkrankte Tiere geschieht nach FENNER (1949c) über Kot, Harn und Speichel. Tiere mit Hautveränderungen streuen das Virus nach TUFFERY (1956) in ihre Umgebung zwischen dem 7. und 21. Tag in großen Mengen mit abgeschilferten Hautmaterial. Auf diese Weise kann das Virus durch lebende und tote Vektoren verschleppt werden.

Künstliche Infektionen mit Virusmaterial aus Verreibungen von Lebern, Milzen und anderen Geweben, sowie von der Chorioallantoismembran bebrüteter Hühnereier und aus Zellkulturen haften bei empfänglichen weißen Mäusen gut. Dabei hängt der Krankheitsverlauf vom jeweils angewandten Infektionsmodus ab. Erprobt sind die intradermale, subkutane, intravenöse, intraperitoneale, intrazerebrale, intranasale und die orale Infektion.

Nach FENNER (1949b) zieht die intraperitoneale Infektion bei entsprechend hoher Dosierung eine rasch verlaufende Erkrankung ohne Hautveränderungen nach sich, die fast stets zum plötzlichen Tode führt. Die orale Infektion mit einer Schlundsonde soll nach GÖNNERT (1942) eine rasche Generalisation zur

Folge haben, die zu typischen Leberveränderungen führt. Intranasal verabreichtes Virus hingegen bewirkt nach KIKUTH und GÖNNERT (1940) ein Krankheitsgeschehen, das mit starken pneumonischen Symptomen verbunden ist und die Tiere ebenfalls bald sterben läßt. Im Gegensatz dazu führt die orale Aufnahme geringer Virusdosen nur zu protrahierten Krankheitsverläufen bis subklinischen, ja sogar latenten Infektionen.

Neben dem Infektionsmodus bestimmt auch das Alter der Tiere den Verlauf der Ektromelie-Erkrankung. So vermehrt sich das Virus bei kurzer Inkubationszeit sehr schnell in Säuglingsmäusen, vermutlich wegen des noch unvollständig ausgebildeten Immunapparates. Etwa 8 Wochen alte Tiere weisen nach SCHELL (1960) eine überdurchschnittliche Resistenz gegenüber der Ektromelie auf, während die Empfänglichkeit für etwa 1 Jahr alte und ältere Tiere wieder ansteigt. Außerdem weisen einige Autoren auf geschlechtsspezifische Unterschiede der Widerstandskraft gegen Mäusepocken hin (HORZINEK und HÖPKEN 1965b, SCHELL 1960, ZELLER und RECKZEH 1965). Männliche Tiere erkranken demnach schwerer als weibliche.

2.7. Diagnostik

An Hand der pathognomischen klinischen Befunde an den Extremitäten, am Kopf und auch auf der Haut läßt sich die Mäusepockenerkrankung in einem Bestand bei subakut- bis chronischer Verlaufsform relativ gut erkennen. Differentialdiagnostisch sind hier allerdings Kratz- und Bißverletzungen zu berück-

sichtigen; sie führen ebenfalls gelegentlich zu Schwellungen, Auftreibungen und auch Amputationen. Die Diagnose akuter, subklinischer und latenter Verlaufsformen bedarf eingehender Untersuchungen, zumal sie differentialdiagnostisch gegenüber bakteriellen Septikämien bei der akuten Verlaufsform und gegen andere Viruskrankheiten abgeklärt werden müssen. Hierzu bieten sich eine ganze Reihe von Verfahren an: Das älteste ist die histologische Untersuchung auf intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen.

Zur Erregerisolierung und Identifizierung eignet sich besonders gut das embryonierte Hühnerei, bei dem die typische Herdbildung auf der Chorioallantoismembran nach der Beimpfung einen hohen Grad an Spezifität aufweist. Die Impfprouben werden aus Verreibungen von Organen wie Leber, Milz, Lunge oder Darm gewonnen. Daneben können die Anzüchtung der Erreger in Zellkulturen und Übertragungsversuche auf empfängliche Mäuse in Betracht gezogen werden.

Als schnellster direkter Virusnachweis gilt die elektronenmikroskopische Darstellung negativ kontrastierter Viruspartikel aus Organverreibungen eventuell nach entsprechender Konzentration und Reinigung.

Antikörper werden in der Routinediagnostik am besten mit der Hämagglutinationshemmungs-Reaktion nachgewiesen (HORZINEK 1965a). Sie eignet sich auch gut zur Überwachung nicht immunisierter Bestände (ROHDE und KARASEK 1970). Der Virusneutralisationstest als Plaque-Reduktionsmethode findet nur selten Anwendung.

Zum Nachweis latenter Infektionen wurde der Agar-gelpräzipitationstest von HORZINEK (1965b+c) und die indirekte Immunofluoreszenz-Methode von CHRISTENSEN (1966) empfohlen. Von ROHDE und KARASEK (1970) wird dagegen die Antigendarstellung mit Hilfe der Immunofluoreszenz als weniger brauchbar eingeschätzt, da sie nur bei Vorliegen von Hautveränderungen und Organalterationen positiv ausfällt, nicht aber inapparente Infektionen anzeigt. Das Verfahren ist im Vergleich zu den anderen diagnostischen Methoden sehr arbeitsaufwendig.

2.8. Immunität bei Mäusepocken

Als Folge einer natürlichen oder künstlichen Ektromelieinfektion bildet sich in der Regel eine belastbare Immunität aus. Ihre Wirksamkeit beruht auf zellulären und humoralen Faktoren, deren Entstehung die Mobilisierung aktivierter T-Lymphozyten voraussetzt. Nach BLANDEN (1974) stammen diese aus dem Pool der zirkulierenden kleinen Lymphozyten. Sie provozieren nach Erkennen des Virusantigens im geschädigten Leberparenchym eine entzündliche Zellinfiltration. Dabei stellen Makrophagen sowohl nach Zahl, wie nach Funktion den überwiegenden Zelltyp dar. Sie sorgen zwischen dem 4. und 6. Tag für die Eindämmung der Virusvermehrung, indem sie infektiöses Virus und nekrotisches Gewebe phagozytieren und zerstören. Humorale Antikörper treten meist nicht vor dem 7. oder 8. Tag auf. Bei ihnen handelt es sich um komplementbindende, neutralisierende, präzipitierende und hämagglutinationshemmende Antikörper. Nach welcher Zeit sie im peripheren Blut erscheinen, hängt vom jeweiligen Infektionsmodus und der eingebrachten Virusmenge ab. Spezifische neutralisierende Antikör-

per lassen sich im Blut nach aerogener Infektion bereits sechs Tage post infektionem erstmals nachweisen (HERRLICH 1967). Dagegen sind hämagglutinationshemmende Antikörper nach intraplantarer Infektion erst ab dem 8. Tage p.i. zu finden (HORZINEK und HÖPKEN 1965a). Die Titermaxima werden in der dritten Woche p.i. erreicht. Der Verlauf der Titerkurve zeigt bei nasaler Applikation von Ektromelievirus einen steilen Anstieg, der aber rasch wieder abfällt. Die Antikörperkurve nach intraperitonealer Infektion steigt gegenüber letzterer gering verzögert auf etwa gleiches Niveau an, um dann langsam abzusinken. Bei intraplantarer Applikation zeigt sich eine ähnliche Kurve, allerdings mit niedrigerem Titer. Bei peroraler-enteraler Virusaufnahme besteht eine starke Abhängigkeit von der Infektionsdosis bezüglich des Beginns der Produktion hämagglutinationshemmender Antikörper (HORZINEK und HÖPKEN 1965b). Die HAH-Antikörpertiter sinken mit der Zeit ab und fallen bei einem Teil der Tiere sogar unter die Nachweisgrenze. Entsprechende Untersuchungen über die Verweildauer virusneutralisierender Antikörper sind nicht bekannt.

Neben diesen serologisch erfaßbaren Immunitätskomponenten, die allein noch keine Aussage über das Bestehen eines belastbaren Infektionsschutzes liefern, sind zellständige Antikörper zu berücksichtigen. Da aber Verfahren, wie sie zur Ermittlung der Gewebsimmunität mit der Leukozytolyse nach Pockenschutzimpfungen beim Menschen eingesetzt werden (ENGELHARDT 1967), für die Ektromelieinfektion nicht erprobt sind, kann nur die Belastungsinfektion eindeutige Daten über die Immunitätslage eines Tiers liefern. Nach FENNER (1948a+b) schwindet der Schutz nur langsam. Deshalb sollen

Testinfektionen ein Jahr nach der Erstinfektion ohne Generalisation verlaufen und nur zu lokaler Erregervermehrung führen.

Humorale Antikörper gegen Ektromelie werden über Plazenta und Kolostrum von Muttertieren auf die Nachkommen übertragen, die so bis zum Absetzen gut geschützt sind. Frisch abgesetzte Tiere sind hoch empfänglich, sobald der passiv erhaltene Schutz abgebaut ist.

2.9. Bekämpfung und Prophylaxe

Die Tilgung der infektiösen Ektromelie in einem Bestand erfolgt am zweckmäßigsten durch Ausmerzungen aller Tiere, sowohl der erkrankten als auch der verdächtigen und latent infizierten Mäuse. Nach Desinfektion der Käfige, Räumlichkeiten, Geräte usw. kann mit einer neuen Aufzucht aus virusfreien Beständen in Isolierställen begonnen werden (FENNER 1948b), wenn Vorsorge gegen neuerliche Einschleppung des Erregers getroffen wird. Sowohl die sofortige Vakzination der Nachzucht von isoliert gehaltenen infizierten Beständen als auch die Möglichkeit, Mäusesepocken durch Chemotherapeutika wie Isatin-Beta-Thiosemicarbazon oder Kupfer- und Rhodan-Verbindungen zu behandeln (BAUER 1958), sollten aus epidemiologischen Erwägungen heraus besser unterbleiben. (RÖHRER 1967, BAUER und SADLER 1961).

Für Tiere, die konventionell gehalten werden und für bestimmte Zwecke längere Zeit geschützt sein sollen, wird heute in großem Ausmaß eine Immunprophylaxe mit Vacciniavirus erfolgreich angewandt (siehe Kapitel 3). Sie bietet einen hohen Schutz

gegen das Mäusepockenvirus, wobei die Tiere für andere als Pockenviren voll empfänglich bleiben. Als Kontrollmaßnahme empfiehlt sich bei nicht geimpften Populationen die stichprobenweise, in regelmäßigen zeitlichen Abständen durchgeführte serologische Untersuchung gesund erscheinender Tiere auf hämagglutinationshemmende Antikörper (vergleiche 2.7.).

3. Grundsätzliches zur Immunisierung gegen Mäusepocken

Auf die Möglichkeit, Mäuse gegen die infektiöse Ektromelie mit aktivem Vacciniavirus zu impfen, verweisen bereits BURNET und BOAKE (1946) und FENNER (1947b). Durch die immunologische Verwandtschaft beider Erreger vermag das Vacciniavirus in der Maus eine ausreichende Immunität zu erzeugen (BRIODY 1959, TRENTIN und FERRIGNO 1957, ZELLER und RECKZEH 1965). Der erzielte Schutz ist nicht so gut, wie nach einer überstandenen Ektromelie-Infektion (FENNER 1949a). Das läßt sich quantitativ anhand der komplementbindenden und der hämagglutinationshemmenden Antikörper und im Kreuzimmunotest nachweisen (DICKINSON 1948).

3.1. Impfstoffe

Zur Vakzinierung wird aktives Vacciniavirus verwendet, wie es auch im Pockenschutzimpfstoff enthalten ist. Demgemäß waren die anfangs eingesetzten Vakzinen Dermo-Impfstoffe vom Schaf (TRENTIN und FERRIGNO 1957), beziehungsweise vom Rind (PEARSON 1957) oder Ei-Vakzinen, die unverändert, d.h. mit dem für die Pockenimpfstoffe vorgeschriebenen Mindesttiter appliziert wurden. Seit

1965 werden überwiegend Zellkultur-Impfstoffe verwendet (ZELLER und RECKZEH 1965). Sie erwiesen sich den oben erwähnten Vakzinen als ebenbürtig.

Impfstoffe aus inaktiviertem homologem Virus sollen einen ausreichenden Schutz bieten (KONOSH 1958). Eine Bestätigung fand diese Beobachtung nicht.

3.2. Impfmethoden

Die gebräuchlichsten Impfmethoden sind die kutane und die intraperitoneale Applikation der Impfstoffe. Die eingesetzten Dermo- bzw. Ei-Vakzinen wurden in der Regel kutan über Schnitt- bzw. Skarifikationsimpfung verabreicht. Gewebekultur-Impfstoffe werden überwiegend i.p. verimpft. Die kutane Vakzinierung geschieht meist an der Schwanzwurzel (SALAMAN 1956), an der es zur Ausbildung von Impfpusteln kommt. Die Methode hat den Nachteil, daß bei Routineimpfungen aktives Vacciniavirus im Käfig und im Bestand verbreitet wird, was auch für ungeimpftes Pflegepersonal nicht ungefährlich ist. Die leichte Kontrolle des Impferfolges als Vorteil des Verfahrens fällt gegenüber dieser Infektionsgefahr nicht ins Gewicht (MUNZ persönliche Mitteilung). Aus arbeitstechnischen Gründen konnte sich die i.v.-Vakzinierung nicht durchsetzen. Als weniger gebräuchliches Verfahren gilt ferner die nasale Vakzinierung, wie sie FENNER (1949a) empfahl. Die Dosierung sollte so sein, daß bei den Tieren hämagglutinationshemmende Antikörper im Serum auftreten. Ist die verabreichte Virusmenge zu gering, so kommt es nicht zur Ausbildung nachweisbarer Antikörper und die Impflinge bleiben empfänglich. Hierzu vertritt BRIODY (1959) die Ansicht, daß zwar ein gut immunisierender Vacciniavirus-Stamm zu verwenden sei, er dürfe

beim Impfling jedoch keine hämagglutinationshemmenden Antikörper hervorrufen, da sonst die Möglichkeit einer serologischen Ektromelie-Diagnose verloren gehe. Er hält für die Immunisierung von Mäusen daher den Vacciniavirusstamm IHD-T, der kein Hämagglutinin mehr besitzt, für besonders geeignet.

Durchgesetzt hat sich heute allgemein die intraperitoneale Impfung. Dabei werden in der Regel 0,1 ml Impfstoff (entsprechend ca. $10^6 \text{KID}_{50}/\text{ml}$) verabreicht. Die Methode zeichnet sich durch eine schonende Behandlung der Tiere aus und gewährleistet einen sicheren Schutz gegen eine Infektion (ZELLER und RECKZEH 1965). Da aber immer noch jedes Tier einzeln injiziert werden muß, was bei größeren Beständen eine enorme Arbeitsbelastung bedeutet, haben MUNZ et al. (1974a) Untersuchungen zur peroralen Immunisierung mit Vacciniavirus gegen Mäusepocken angestellt. Man versprach sich davon, eine gute Immunität durch eine teilweise Nachahmung des natürlichen Infektionsweges zu erzielen. Die Autoren kamen zu der Erkenntnis, daß eine orale Immunisierung gegen Mäusepocken prinzipiell möglich ist, sofern genügend hochtitriger Impfstoff über eine Magensonde verabreicht wird. Die spontane Aufnahme einer Trinkwasservakzine führte in den Versuchen dagegen nur zu einer unbefriedigenden Antikörperbildung.

Die intraperitoneale Impfung verleiht eine Immunität über mindestens 6 Monate. Nachimpfungen bewirken eine Boosterung, trotzdem sinkt der Impfschutz binnen weniger Monate wieder ab (ZELLER und RECKZEH 1965).

4. Aerosol- bzw. nasale Immunisierungsversuche bei Pockeninfektionen

Die kutane Pockenschutzimpfung des Menschen wird seit langem aus vielerlei Gründen als verbesserungswürdig angesehen. In jüngster Zeit versucht man deshalb, sie unter anderem durch Vakzinationsverfahren zu ersetzen, die den natürlichen Infektionsmodus - also die Aufnahme des Virus bzw. Antigens über den Atemtrakt - nachahmen, eine gute Immunität verleihen, aber selbst keine ins Gewicht fallende Impferkrankung mehr verursachen. Die Durchführbarkeit derartiger Überlegungen war allerdings an geeignete Impfstoffe gebunden. Die ersten tierexperimentellen Grundlagenversuche zu dieser Problematik führten HOCHSTEIN-MINTZEL et al. (1972) durch. Die Autoren prüften die Immunogenität bei nasaler Applikation von Vacciniavirus an Kaninchen und Mäusen. Sie wiesen bei Kaninchen nach Instillation von 10^4 VE in beide Nasenlöcher eine Immunität nach, die eine Generalisation nach einer i.v. Belastungsinfektion mit 10^7 VE 14 Tage p.vacc. verhinderte. Bei einer nasal verabreichten Impfdosis von 10^5 VE blieb auch eine kutane Impfreaktion aus. Die Autoren stellten ferner fest, daß orale Immunisierungsversuche bei Mäusen wesentlich erfolgreicher waren, wenn das Impfvirus auch mit der respiratorischen Schleimhaut in Berührung kam, eine Vermutung, die auch schon MUNZ et al. (1974a) bei oralen Vakzinationsversuchen von Mäusen gegen Ektromelie anstellten.

Von besonderem Interesse sind hier jedoch die von MUNZ et al. (1974b) berichteten Ergebnisse bei der Aerosolvakzination von Kanarienvögeln gegen Kanarienspocken. Die Autoren verwandten einen homologen att-

nuierten Kanarienspocken-Virusstamm, von dem sie je 3ml ($10^{5,75} \text{KID}_{50}/\text{ml}$) fünf Mal an aufeinander folgenden Tagen auf 7 Vögel versprayten, dabei waren 6 von 7 Tieren gegen eine Testinfektion immun. Zweimalige Aerosol-Applikation von je 6 ml Impfstoff schützte immerhin noch 2 von 4 Impflingen. Die nasale Applikation des gleichen Impfstammes, bei der 0,05 ml pro Tier auf die Nasenöffnungen zweimal im Abstand von 8 Tagen aufgetragen wurden, erbrachte ebenfalls bei zwei von 4 Tieren einen Schutz gegen die Testinfektion. Die Autoren folgern daraus, daß eine Verbesserung des Impfschutzes dann erreichbar sei, wenn auch respiratorisches Epithel am Immunisierungsvorgang beteiligt wird.

5. Eigene Untersuchungen

5.1. Material und Methoden

5.1.1. Abkürzungen

CAM(s)	= Chorioallantoismembran(en)
CVA	= Vacciniavirus-Stamm "Ankara", attenuiertes Virus der 550. Passage in Zellkulturen primärer Hühnerembryofibroblasten
CVB	= Vacciniavirus-Stamm "Bern", an embryonale Rindermuskelzellen adaptiertes, nicht attenuiertes Virus
ERM-Zellen	= primäre embryonale Rindermuskelzellen
3T6-Zellen	= permanenter Mäusefibroblasten-Zellstamm der Fa. Flow Laboratories
FHE-Zellen	= primäre Hühnerfibroblasten
HAH-Test	= Hämagglutinationshemmungstest
KID ₅₀	= Virusdosis, die bei 50 % der inokulierten Zellkulturen einen spezifischen zytopathischen Effekt erzeugt
LD ₅₀	= Virusdosis, die 50 % der inokulierten Versuchstiere tötet
PBS	= Phosphat-gepufferte Salzlösung nach Dulbecco
PBST	= Phosphat-gepufferte Salzlösung nach Dulbecco mit einem Gehalt von 0,25 % Trypsin
RAF	= Rinder-Amnionflüssigkeit
zpe	= zytopathischer Effekt

5.1.2. Medien

Für den Ansatz von Zellkulturen kamen folgende Medien zur Anwendung:

FHE-Kulturen: Zur Anzucht fand Lactalbumin (0,5 % Difco)-Yeast-(0,1 % Difco)-Medium mit 10 % Kälberserum und üblichem Phenolrotzusatz Verwendung. Beimpfte Zellkulturen hielten wir unter RAF mit üblichem Phenolrotzusatz.

3T6-Kulturen: Zur Zellzüchtung diente "Eagle"-Medium (Fa. Flow Lab.) mit 10 % foetalem Kälberserum. Als Erhaltungsmedium infizierter Kulturen benutzten wir "Eagle"-Medium ohne Serumzusatz. Alle genannten Medien enthielten 100 γ Streptomycin und 100 IE Penicillin-G-Na pro ml.

5.1.3. Zellkulturen

Das Virusmaterial für die Untersuchungen züchteten wir je nach Virusstamm auf primären FHE-Kulturen und auf permanenten 3T6-Mäusefibroblasten-Kulturen. Bei der Herstellung von FHE-Zellkulturen hielten wir uns an das allgemein bekannte Verfahren (DUL-BECCO 1952).

Embryonierte Hühnereier wurden am 10. Tag geöffnet, und die Embryos unter sterilen Kautelen entnommen. Ständer, Flügel und Augen wurden reseziert, der Körper in eine 50 ml Rekordspritze mit Veterinärkonus gefüllt und dann in einen Erlenmeyerkolben

gepreßt. Anschließend wuschen wir das Gewebe so lange mit PBS, bis der Überstand keinen Detritus oder keine Erythrozyten aufwies. Er wurde jeweils verworfen. Danach setzten wir für ca. 10 Minuten PBST zum Gewebssediment zu, um mit dieser Vortrypsinierung eine zu starke Verdünnung des Trypsins im eigentlichen, sich anschließenden Aufschließungsprozeß zu vermeiden. Nach Verwerfen des Überstandes wurde erneut PBST zum Sediment im Verhältnis 1 : 20 hinzugefügt. Die Suspension verblieb danach während 2 Stunden auf dem Magnetrührer bei 37° C im Brutschrank.

Nach der Filtration der PBST-Zellsuspension durch eine 4-fache Mullage wurde bei 250 x g 20 Minuten lang zentrifugiert und das Zellsediment in Anzuchtmedium mit der Rekordspritze resuspendiert. Schließlich wurde nach einer zweiten Filtration durch eine 6-fache Lage Mull der Zellgehalt in einer Thomakammer ausgezählt und auf 500 000 Zellen pro ml eingestellt. Je nach Verwendungszweck beschickten wir Rouxschalen mit je 100 ml, Vierkantkolben mit je 20 ml oder Leightonröhrchen mit je 2 ml Zellsuspension.

Binnen vier Tagen wuchsen die Zellen im Brutschrank bei 37° C zu einem dichten, einschichtigen Zellrasen aus; in diesem Stadium tauschten wir das Wachstumsmedium gegen Erhaltungsmedium aus.

Die Kulturen in Rouxschalen und in Vierkantkolben setzten wir für die Virusanzucht, bzw. Virusvermehrung ein, diejenigen in Leightonröhrchen benutzten wir für Titrationsen.

Die Kulturen der 3T6-Zellen wurden in Vierkantkolben und Rouxschalen angesetzt. Nach ca. drei Tagen Aufenthalt im Brutschrank bei 37° C war der einschichtige Zellrasen dicht und konnte weiter passiert werden oder nach Absaugen des Anzuchtmediums und dessen Ersatz durch Erhaltungsmedium infiziert werden.

Zur Ablösung der Zellen von der Glaswand zur Weiterpassierung fügten wir nach Entfernung des Mediums PBST hinzu, saugten die Lösung nach einer Minute ab und stellten die angefeuchteten Kulturen für fünf Minuten in den Brutschrank. Die sich ablösenden Zellen konnten dann resuspendiert und im Verhältnis 1 : 5 zur Ausgangsmenge verdünnt und in Kulturfäße eingefüllt werden.

5.1.4. Virusstämme

5.1.4.1. Impfstämme

Für die Immunisierung der Mäuse verwendeten wir:

- a) den attenuierten Vacciniavirus-Stamm CVA "Ankara" aus der 550. Passage, er lag als 549. FHE-Passage vor.
- b) den nicht attenuierten Vacciniavirus-Stamm "Bern". Er ist an ERM-Zellen adaptiert. Seine Unschädlichkeit für Mäuse und seine immunogene Wirkung gegen infektiöse Ektromelie waren bekannt (MUNZ et al. 1974a).
- c) Attenuiertes Ektromelie-Virus vom Stamm "Hampstead".⁺

⁺Wir bedanken uns für die freundliche Überlassung dieses Virusstammes bei Dr. R. V. Blanden, Dept. of Microbiology, The John Curtin School of Medical Research, The Australian National University Canberra A.C.T. 2601, Australia

5.1.4.2. Challenge-Virus

Für die Belastungsinfektion der immunisierten Mäuse benutzten wir Ektromelie-Virus, Stamm "Düsseldorf E2". Er lag als 26. Passage in 3T6-Zellen vor. Seine Virulenz erwies sich bei der Bestimmung der LD_{50} als nahezu gleichwertig derjenigen des von MUNZ et al. (1974a) verwendeten Testinfektionsvirus.

5.1.5. Viruszüchtung

Zur Vermehrung des Vacciniavirus-Stammes CVA beimpften wir Monolayers von FHE-Zellen in Rouxschalen mit 80 ml RAF, die $1,6 \times 10^{8,25} KID_{50}$ enthielten. Nach drei Stunden Adsorptionszeit wurde das Medium mit dem nicht adsorbierten Virus abgesaugt und nach mehrmaligem Waschen mit PBS durch 100 ml neue RAF ersetzt.

Nach zwei Tagen p.i. ließ sich ein spezifischer zpE erkennen: er zeigte sich anfangs als herdförmige Regionen, in denen die Zellen aufgequollen waren und sich abkugelten. Dieser Effekt griff rasch um sich, es kam zur Generalisation. Wenn dieses Stadium etwa am dritten Tag voll ausgebildet war, ernteten wir das Virus noch vor der vollständigen Lysis der Zellen. Dazu froren wir das Material bei $-20^{\circ}C$ ein und tauten es unter Schütteln wieder auf. Zur weiteren Aufschließung und Homogenisierung schlossen wir eine 1 minütige Behandlung mit einem Homogenisator (Ultraturrax der Fa. Jahnke und Kunkel) im Eisbad an. Danach wurde der Zelldetritus kurz bei $2200 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand als Impfstoff in Portionen zu je 100 ml abgefüllt und bei $-20^{\circ}C$ gelagert. Von

einer Probe führten wir zur Ermittlung des KID_{50} -Wertes eine Titration durch.

Vom Vacciniavirus-Stamm CVB stand uns genügend Material zur Verfügung. Es wies einen Virusgehalt von $10^7 KID_{50}$ pro ml auf und bestand aus einer Virussuspension in Lactalbumin-Yeast-Medium.

Der attenuierte Ektromelie-Virusstamm "Hampstead" lag uns vor in Form einer gefriergetrockneten Verreibung infizierter CAM, deren Virusgehalt mit 2×10^6 PFU/ml (plaques on 929 cells) angegeben war. Nach Auflösung des gesamten Materials in 5 ml Aqua dest. wurden je 2 ml auf 2 Vierkantkolben mit 3T6-Zellen verimpft. Nach dreistündiger Adsorptionszeit bei $35^{\circ} C$ wurde nicht absorbiertes Virus abgesaugt und gegen 20 ml Erhaltungsmedium ausgetauscht. Die Kulturen hielten wir bei $35^{\circ} C$ im Brutschrank, bis sich nach 4 Tagen ein zpE einstellte. Er entsprach den durch virulentes Ektromelievirus verursachten Veränderungen (vgl. unten).

Das Virusmaterial für die Testinfektionen mit dem Ektromelievirus-Stamm "Düsseldorf" züchteten wir in analoger Weise in 3T6-Zellen. Wenn sich nach 4-tägigem Verbleiben im Brutschrank bei $35^{\circ} C$ ein spezifischer zpE mit Quellung und traubenförmiger Abrundung, mit Riesenzellbildung und verstärkter Lichtbrechung generalisiert zu erkennen gab, ernteten wir das Virus, bevor sich die Zellen abzulösen begannen. Dazu froren wir die Kolben bei $-20^{\circ} C$ ein, um beim Wiederauftauen intrazelluläres Virus freizusetzen. Nach kurzer Zentrifugation bei $2200 \times g$ wurde der Überstand als Infektions-Virussuspension in kleinen Mengen zu je 5 ml abgefüllt und bei $-20^{\circ} C$

eingefroren. Zur Bestimmung der KID_{50} -Dosis wurde in Leightonröhrchen eine Titration vorgenommen (vgl. 5.1.6.1.) und die LD_{50} -Dosis für Mäuse ermittelt (vgl. 5.1.6.2.).

5.1.6. Virustitrationen

5.1.6.1. KID_{50} -Bestimmung

Um die Viruskonzentrationen der zur Immunisierung verwendeten Vacciniavirus-Stämme CVA und CVB, des Ektromelievirus-Stammes "Hampstead" und des zur Testinfektion benutzten virulenten Ektromelievirus-Stammes "Düsseldorf E2" festzustellen, verwendeten wir FHE-Kulturen in Leightonröhrchen: Je 4 Röhrchen wurden mit je 1 ml der nach Zehnerpotenzen mit RAF hergestellten Virusverdünnungen infiziert bei einer Vorlage von 1 ml RAF als Erhaltungsmedium je Röhrchen. Der Zellrasen in ihnen war stets dicht geschlossen. Täglich kontrollierten wir die Entwicklung des zpE bis am 7. Tag die Ablesung erfolgte. Für die eingesetzten Virusstämme ergaben sich folgende KID_{50} -Werte (Berechnung nach KÄRBER 1931):

Vacciniavirus-Stamm CVA (550. Passage)...	$10^{7,0} KID_{50}/ml$
Vacciniavirus-Stamm CVB.....	$10^{7,0} KID_{50}/ml$
Ektromelievirus-Stamm "Düsseldorf E2"...	$10^{5,75} KID_{50}/ml$
(26. Passage)	
Ektromelievirus-Stamm "Hampstead".....	$10^{5,5} KID_{50}/ml$

5.1.6.2. LD₅₀-Bestimmung

Zur Ermittlung der Virusdosis, die für die Challengeinfektion eingesetzt werden sollte, mußte die LD₅₀ bestimmt werden: Gruppen von je 10 Mäusen wurden mit jeweils einer nach Zehnerpotenzen ansteigenden Virusverdünnung mit je 0,1 ml intraperitoneal infiziert. Bei täglicher Beobachtung der im Isolierstall gehaltenen Tiere schlossen wir den Test 20 Tage p.i. ab. Die bis dahin gestorbenen Mäuse wurden auf spezifisch pathologische Veränderungen untersucht und die Sterberaten pro Verdünnungsstufe ermittelt. Die Auswertung erfolgte nach BONIN (1973). Für das virulente Ektromelievirus ergab sich eine LD₅₀/0,1 ml von 10^{5,33}.

5.1.7. Versuche zum Virusnachweis nach Aerosol-Applikation von Vaccinia- und Ektromelie-Virus

Zur Beurteilung der Tierversuche war es wünschenswert zu erfahren, ob es nach einer Virus-Aerosol-Applikation zu einer Adsorption der Erreger in der Lunge kommt und ob die Todesfälle nach Infektion mit virulentem Ektromelievirus als spezifisch zu werten waren.

Je zwei Mäusen, die virulentes Ektromelievirus über 3 und 10 Minuten als Aerosol eingeatmet hatten, wurde sofort danach Blut entnommen und dann Lunge und Leber evisceriert. Dabei achteten wir darauf, daß es zu keiner Kontaktkontamination mit anderen eventuell virushaltigen Organen oder Körperstellen kommen konnte. Wir froren das Material bei -20° C ein und verrieben es während des Auftauens im Mörser. Diese Ver-

reibungen suspendierten wir in PBS: bei Lunge und Leber im Verhältnis 1 : 5, bei Blut 1 : 2. Nach dem Abzentrifugieren bei 2200 x g über 5 min. verimpften wir je 0,1 ml vom Überstand auf die CAM 10 Tage bebrüteter Hühnereier. Nach 5 Tagen wurden die CAMs auf spezifische Veränderungen untersucht.

Bei Vacciniavirus-infizierten Mäusen gingen wir in analoger Weise vor, doch kontrollierten wir die Membranen schon 3 Tage p.i..

5.1.8. Versuchstiere und Versuchsbedingungen

Die Versuche wurden mit insgesamt 978 weißen Mäusen, Stamm NMRI, durchgeführt. Für die Vorversuche verwendeten wir institutseigene Tiere, für den Hauptversuch solche der Fa. "WIGA", Wolfratshausen. Wir fütterten die Tiere mit Pellets (Fa. ALTROMIN, Lage/Lippe) ad libitum und hielten sie in Gruppen zu je 10 bzw. 20 Tieren in Makrolonkäfigen der Größe II bzw. III. Immunisierte Tiere und Kontrolltiere hielten wir von elektromelie-infizierten Tieren (Belastungs- und Infektionsversuche) räumlich getrennt. Die letzteren waren in einem Isolierstall, ausgerüstet mit einer Schleuse für Personen und Material, untergebracht.

Vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse zwei Wochen beobachtet. Wir entnahmen Blutproben - das Blut von jeweils 5 Tieren wurde gepoolt - um das Serum auf orthopoxspezifische hämagglutinationshemmende Antikörper zu untersuchen (= O-Proben). Es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet, da sie weniger durch geschlechtsgebundenes Verhalten - Raufereien und Beiße-

reien - den Versuchsverlauf beeinträchtigen und damit das Erkennen einer Ektromelie-Infektion erleichtern. Zum Zeitpunkt der LD₅₀-Bestimmung (vgl. 5.1.6.2.) waren sie 4 - 5 Wochen alt, mit ca. 7 Wochen erfolgte die erste Vakzination und im Alter von ca. 3 Monaten setzten wir die Challengeversuche an.

5.1.9. Immunisierungs- und Infektionsmethoden

Ziel unserer Immunisierungsversuche war es, Impfstoff-Aerosole auf Unschädlichkeit und Wirksamkeit im Vergleich zu anderen möglichen bzw. gebräuchlichen Applikationsarten zu untersuchen. Daneben galt es, verschiedene Infektionsmethoden zur Beurteilung der Challengeversuche zu testen.

Folgende Applikationsmethoden kamen vergleichend zur Anwendung: Aerosol-Applikation

Wir verstäubten zur Immunisierung die Vacciniavirus-Suspensionen CVA, CVB und den Ektromelievirus-Stamm "Hampstead" und in Versuchen zur Klärung der Abhängigkeit des Infektionsverlaufes von der Applikationsart den Ektromelievirus-Stamm "Düsseldorf E2" in einer ca. 30 cm langen Glasröhre von 8 cm Durchmesser. In ihr fanden gut 10 Mäuse Platz. Die vordere große Öffnung, über die die Kammer beschickt wurde, verschlossen wir mit einem durchbohrten Gummistopfen, durch den beim Sprayvorgang das Aerosol über einen Schlauch zu den eingeschlossenen Tieren gelangte. Das Ende des Rohres war mit einem kleinen Abluftloch von 0,7 cm Ø versehen. Von hier lief ein Schlauch zu der mit Formalin gefüllten Inaktivierungskammer, in der das in austretender Luft enthaltene Virus abgefangen und abgetötet

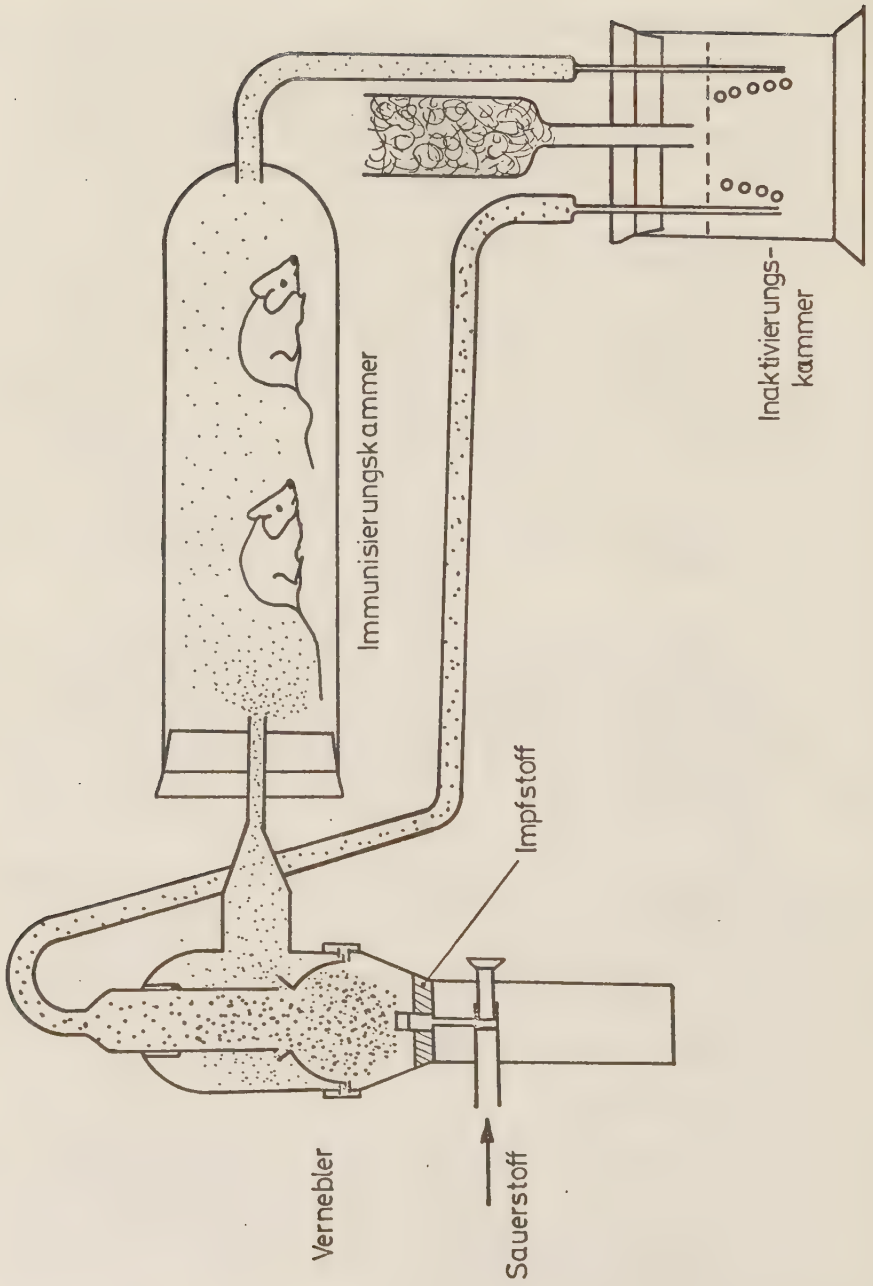
werden sollte. Es galt zu vermeiden, daß Vacciniavirus entweicht, den Stall verseucht oder gar Menschen gefährdet. Zur zusätzlichen Sicherung wurden die Aerosolapplikationen in einem Micro-Flow-Gerät (Fa. Micro Flow LTD.-FLEET-HANTS, England) durchgeführt.

Das Aerosol erzeugten wir mit dem Sauerstoff-Aerosol-Gerät "Oxyparat" (Fa. ALLIHN & Co., München). Es entwickelt einen Nebel, dessen Tröpfchen bei einem Sauerstoffdruck von 1,5 atü. nach Herstellerangaben 0,5 - 5 μm Durchmesser haben. Wir änderten das Gerät geringfügig ab, indem wir den "Zuluftkamin" über einen Schlauch mit der oben erwähnten Inaktivierungskammer verbanden (siehe Zeichnung Seite 38). Weiterhin fügten wir zur besseren Abdichtung des Systems eine Gummidichtung zwischen Zuluftkamin und Spraygutbehälter ein, nachdem dessen Gewindeansatz um ca. 2 mm gekürzt worden war.

Für ca. 5 oder 10 Minuten setzten wir die Tiere dem Virus-Sauerstoffgemisch aus, dabei wurden zwischen 1,5 und 5 ml der Virussuspension versprüht. Impfstofftröpfchen setzten sich, während die Tiere inhalierten, auch auf das Fell, so daß sie während des Sprayvorganges eine rege Putztätigkeit zeigten.

Zur prinzipiellen Überprüfung, ob es zu einer Teilchenaufnahme in die Lunge nach Aerosolapplikation kommt, ließen wir 3 Mäuse ein Tusche-Aerosol (im Verhältnis 1 : 1 mit Wasser verdünnt) über 5 Minuten einatmen und töteten sie nach 10 Minuten. Die herauspräparierten Lungen wurden histologisch untersucht ⁺.

⁺ Wir bedanken uns bei Herrn Prof. Dr. J.v.Sandersleben, Institut für allgemeine Pathologie und Patholog. Anatomie des Fachbereichs Tiermedizin der LMU München für die Durchführung und Beurteilung der histologischen Untersuchungen.



i.p. Applikation

Zu Vergleichszwecken immunisierten wir einen Teil der Mäuse nach dem bisher allgemein üblichen Verfahren, indem wir 0,1 ml der Impfstoffe (Vacciniavirus-Stamm CVA, CVB und Ektromelievirus-Stamm "Hampstead") konzentriert intraperitoneal verabreichten.

Die Challenge-Infektion wurde bei fünf Wochen zuvor immunisierten Mäusen und bei gleichaltrigen, aber ungeimpften Kontrollen mit virulentem Ektromelievirus ebenfalls durch i.p. Applikation durchgeführt. Wir verabreichten eine Dosis von 10^2LD_{50} in 0,1 ml.

Applikation über das Trinkwasser

Zu Vergleichszwecken applizierten wir 50 Mäusen virulentes Ektromelievirus über das Trinkwasser. Nach 24-stündigem Wasserentzug erhielten fünf Gruppen à 10 Tiere die Virus-Verdünnungen 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Jeder Gruppe wurden 10 ml vorgelegt.

Nasale Applikation

Aus den gleichen Gründen verabreichten wir Gruppen von 10 bzw. 20 Tieren die Vacciniavirus-Stämme CVA und CVB, sowie den attenuierten Ektromelievirus-Stamm "Hampstead" und den virulenten Ektromelievirus-Stamm "Düsseldorf E2" nasal. Dies geschah, indem wir jeder Maus zwei Mal im Abstand von acht Tagen 0,03 ml des jeweiligen Virusmaterials auf die Nase tropften, so daß die Flüssigkeit aufgezogen wurde. Virulentes Ektromelievirus wurde nur einmal appliziert.

5.1.10. Unschädlichkeitsprüfung

Zur Prüfung, ob die verwendeten Impfstoffe nach Aerosol-Applikation pathologische Veränderungen hervorrufen, untersuchten wir jeweils 2 bis 4 Tiere 14 Tage p.vacc. Bei getöteten Tieren überprüften wir insbesondere die Mundschleimhaut, die Trachea und die Lunge, sowie Leber und Milz auf makroskopisch erkennbare Läsionen. Zwei Lungen wurden jeweils histologisch untersucht, von denen im Falle des CVA-Virus eine sofort, die andere 7 Tage nach der Immunisierung durch Aerosol herauspräpariert und zuvor in Kaiserlingscher Lösung (zur histologischen Untersuchung) fixiert wurde. Bei den Impfstoffen CVB und Ektromelie "Hampstead" erfolgte die histologische Organkontrolle 14 Tage nach einmaliger Aerosol-Applikation.

5.1.11. Serumgewinnung

Entsprechend der Methode nach NÖLLER (1955) entnahmen wir Blut aus dem retrobulbären Venenplexus mit Äther narkotisierter Mäuse aller Versuchsgruppen. Die Blutproben von jeweils 5 Tieren einer Gruppe vereinigten wir zu einem Pool. Das bei 2200 x g über 10 Minuten abzentrifugierte Serum bewahrten wir bei -20°C bis zur Untersuchung auf hämagglutinationshemmende Antikörper auf.

5.1.12. Hämagglutinationshemmungstest

Zum Nachweis hämagglutinationshemmender Antikörper in den O-Seren und im Serum der immunisierten bzw. infizierten Mäuse hielten wir uns an das von MAYR (1956) angegebene Verfahren.

5.1.13. Versuchsanordnung

Im ersten Vorversuch immunisierten wir insgesamt 130 Mäuse mit dem Vacciniavirus-Stamm CVA. Dabei wandten wir verschiedene Applikationsmethoden an. Es sollten einmal die Unschädlichkeit des Impfstoffes erprobt und andererseits Orientierungsdaten für den Hauptversuch bezüglich Dosierung und prinzipieller Immunisierbarkeit über den Respirationstrakt gewonnen werden. Die einzelnen Parameter vermittelt Tabelle I.

Tabelle I : Immunisierungs- und Infektionsplan für die im 1. Vorversuch ein Mal bzw. zwei Mal vakzinieren Mäuse. Impfstoff: Vacciniavirus-Stamm CVA, 550. Passage, Titer: $10^{7,0}$ KID₅₀/ml
Spraydosierung für jeweils 10 Tiere

Anzahl der Tiere	Applikationsart	Dosis bzw. Expositionszeit	Challengeinfektion mit 10^2 LD ₅₀ Ektromelievirus - Tage nach 1. Vakzination
35	1 x Aerosol	ca. 2,0ml in 10 min	35
35	2 x Aerosol in 8 täg.Abst.	ca. 2,0ml in 10 min	35
10^+	1 x Aerosol	ca. 2,0ml in 10 min	51
10^+	1 x Aerosol	ca. 1,5ml in 5 min	51
20	i.p.	0,1ml pro Tier	35
20	2 x nasal in 8 täg.Abst.	0,03ml pro Tier	35
20	Kontrollen		35

⁺Davon wurden 6 bzw. 7 Tiere auch zur Unschädlichkeitsprüfung mit verwendet

Im zweiten Vorversuch testeten wir den Attenuierungsgrad des Ektromelievirus-Stammes "Hampstead" unter unseren Versuchsbedingungen. Dazu verimpften wir an jeweils 10 Tiere je 0,1 ml des konzentrierten Virusmaterials (entsprechend $10^{4,5} \text{KID}_{50}$) i.p. pro Tier und die Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-5} . Zwei weitere Gruppen von je 10 Tieren erhielten das Virus in Form von Aerosol bei 10 minütiger Exposition, dabei vernebelten wir insgesamt ca. $2 \times 10^{5,5} \text{KID}_{50}$ für jeweils 10 Tiere.

Im Hauptversuch sollten die drei Impfstämme CVA, CVB und Ektromelie "Hampstead" bei unterschiedlichen Applikationsarten auf ihre immunisierenden Eigenschaften verglichen und unter besonderer Berücksichtigung einer Aerosol-Applikation zum Teil mit Boosterung die Wirksamkeit dieses Immunisierungsverfahrens gegenüber einer Challenge-Infektion getestet werden (siehe Tabelle II, Seite 43). Wir setzten hierfür insgesamt 435 Mäuse ein.

Ergänzende Versuche über den Einfluß der Applikationsart von virulentem Ektromelievirus auf den Infektionsverlauf

Zur Beurteilung der Immunisierungs- und Belastungsversuche waren Kenntnisse über mögliche Unterschiede in der Applikation von virulentem Ektromelievirus wünschenswert. Deshalb infizierten wir 2 Tiergruppen von je 10 Mäusen mit virulentem Ektromelievirus durch 3 bzw. 10 Minuten dauernde Aerosolapplikation, während der 3 bzw. 5 ml einer Virussuspension mit $10^{5,75} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ versprays wurden. Gleich große Gruppen erhielten 0,03 ml konzentrierte Virussuspension je Maus nasal bzw. 0,1 ml der

Tabelle II : Immunisierungs- und Infektionsplan für die im Hauptversuch 1mal bzw. 2mal vakzinierten Mäuse. Impfstoffe: Vacciniavirus-Stamm CVA 550. Passage, Titer: $10^{7,0}$ KID₅₀/ml
Vacciniavirus-Stamm CVB, Titer: $10^{7,0}$ KID₅₀/ml, konz.=Konzentrat, verd.=Verdünnung auf $10^{5,5}$ KID₅₀/ml; Ektromelievirus-Stamm "Hampstead", Titer: $10^{5,5}$ KID₅₀/ml

Anzahl der Tiere	Immunisierungsmodus			Challengeinfektion mit $10^{2,0}$ LD ₅₀ Ektromelievirus, Tage n. 1. Vakz.
	Applikationsart, Impfstoff	KID ₅₀ pro Tier	Dosis, Zahl der Impfungen, Expositionszeit	
20	nasal CVB	je $10^{5,47}$	0,03ml konz./Tier 2x 8täg.Abst.	35
20	Aerosol CVB	$10^{6,3}$	ca. 2ml konz. 10min für je 10 Tiere	35
20	Aerosol CVB	je $10^{6,3}$	ca. 2ml konz. 10min 2x 8täg.Abst./10Tiere	35
20	i.p. CVB	10^6	0,1ml konz./Tier	35
20	i.p. CVB	10^4	0,1ml der Verd. 10^{-2} je Tier	35
20	nasal CVA	je $10^{5,47}$	0,03ml konz./Tier 2x 8täg.Abst.	35
20	Aerosol CVA	$10^{6,3}$	ca. 2ml konz. 10min für je 10 Tiere	35
20	Aerosol CVA	je $10^{6,3}$	ca. 2ml konz. 10min 2x 8täg.Abst./10Tiere	35
20	i.p. CVA	10^6	0,1ml konz./Tier	35
20	i.p. CVA	10^4	0,1ml der Verd. 10^{-2} je Tier	35
20	nasal Ektromelie "Hamp"	$10^{3,97}$	0,03ml / Tier 2x 8täg.Abst.	35
20	Aerosol Ektromelie "Hamp"	$10^{4,8}$	ca. 2ml 10min für je 10 Tiere	35
20	Aerosol Ektromelie "Hamp"	je $10^{4,8}$	ca. 2ml 10min 2x 8täg.Abst./10Tiere	35
20	i.p. Ektromelie "Hamp"	$10^{4,5}$	0,1ml je Tier	35
20	nasal CVB	$10^{3,97}$	0,03ml verd./Tier 2x 8täg.Abst.	35
20	Aerosol CVB	$10^{4,8}$	ca. 2ml verd. 10min für je 10 Tiere	35
20	Aerosol CVB	je $10^{4,8}$	ca. 2ml verd. 10min 2x 8täg.Abst./10Tiere	35
20	Aerosol CVA	$10^{4,8}$	ca. 2ml verd. 10min für je 10 Tiere	35
20	Aerosol CVA	je $10^{4,8}$	ca. 2ml verd. 10min 2x 8täg.Abst./10Tiere	35
20	Kontrolle			35

Verdünnung 10^{-2} i.p. verabreicht. Als Trinkwasser-Infizierung setzten wir pro Tier 1 ml der konzentrierten Virussuspension und deren Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-4} vor, wobei auch hier jeweils 10 Mäuse eine Versuchsgruppe bildeten (vgl. Tabelle III).

Tabelle III: Die unterschiedlichen Applikationsmethoden zur Prüfung des Ablaufes einer Ektromelievirus-Infektion ($1 \text{ ml} \triangleq 10^{5,75} \text{KID}_{50} \triangleq 10^{4,33} \text{LD}_{50}$).

Anzahl der Tiere	Applikationsmodus	Dosierung
10	Aerosol 3 min	ca. 3 ml/10 Tiere
10	Aerosol 10 min	ca. 5 ml/10 Tiere
10	nasal	0,03 ml konz./Tier
10	i.p.	0,1 ml konz./Tier
10	oral	1 ml konz. Virus-suspension je Tier
10	oral	1 ml Verdünnung 10^{-1} je Tier
10	oral	1 ml Verdünnung 10^{-2} je Tier
10	oral	1 ml Verdünnung 10^{-3} je Tier
10	oral	1 ml Verdünnung 10^{-4} je Tier

5.2. Versuchsergebnisse

5.2.1. Erprobung des Aerosolgerätes

Der histologische Befund der Lungen zeigte, daß Tusche-partikel mit dem Aerosol aspiriert wurden. Sie gelangten bis in die Alveolen, wo sie zum Teil phagozytiert waren.

5.2.2. Unschädlichkeitsprüfung der applizierten Impfstoffe

Die Verträglichkeit der verwendeten Impfstoffe prüften wir, indem wir 2 bzw. 4 Tiere einer Aerosol-Behandlung mit der jeweiligen Virussuspension unterzogen. Die Sek-tion der nach 7 bzw. 14 Tagen getöteten Tiere ergab weder für den CVA- noch für den CVB-Impfstamm von der Norm abweichende Befunde. Die histologische Unter-suchung ließ keine spezifischen Veränderungen des Lungengewebes erkennen.

Beim Ektromelie-Virusstamm "Hampstead" kam es aller-dings bei Aerosol-behandelten Tieren zu Lungenläsio-nen. Sie hoben sich als bis stecknadelkopfgroße, un-regelmäßig abgegrenzte Areale gegenüber der Umgebung ab. Histologisch fielen starke interstitielle Reakti-onen auf. Sie äußerten sich in Form von perivaskulä-ren und parabronchialen Rundzellinfiltrationen mit Lymphozyten und Plasmazellen. In den Spitzenlappen kam es stellenweise zu Nekrosen. Häufig waren Makro-phagen in den Alveolarlumina zu finden. Schließlich zeigten sich auch eine große Anzahl schwerer Gefäß-thrombosen. Alle diese Veränderungen wirkten sich jedoch

anscheinend nicht auf das Verhalten der Tiere nach der Aerosol-Behandlung aus; Futter- und Tränkeaufnahme sowie Mobilität waren nicht merkbar gegenüber der Kontrollgruppe verschieden.

Die Unschädlichkeit der Vacciniavirus-Impfstoffe CVA und CVB bei i.p. Applikation konnten für Mäuse mit einem Mindestgewicht von 20 g als bekannt vorausgesetzt werden (MUNZ et al. 1974a).

5.2.3. Ergänzende Versuche über den Einfluß der Applikationsart von virulentem Ektromelie-Virus auf den Infektionsverlauf

Nach i.p. Applikation starben die ersten Tiere ab dem 6. Tag post infektionen, ohne vorher auffällig krank gewesen zu sein. Erst nach diesem Zeitpunkt zeigten die Mäuse gesträubtes Fell und waren moribund. Ab dem 10. Tage traten zunächst Konjunktivitiden und Blepharitiden, dann Schwanzläsionen und Schwellungen im Gesicht und an den Gliedmaßen auf. Die Sektion der verendeten Tiere ließ eine starke Exsudatansammlung in Brust- und Bauchhöhle, zum Teil auch Hämorrhagien der Leber erkennen.

Nach nasaler- und Aerosol-Infektion starben die ersten Mäuse erst ab dem 9. Tag, wobei nach 10-minütiger Aerosol-Behandlung die meisten Todesfälle zu diesem Zeitpunkt auftraten (50 %). Die nasale Infektion war hingegen zur selben Zeit nur für eine Maus tödlich. Jedoch wiesen Tiere, die nasal oder mit Aerosol infiziert waren, bereits ab dem 7. Tag Konjunktivitiden, Blepharitiden und Ödematisierungen des Gesichts auf. Schwanz-

nekrosen und Schwellungen der Extremitäten ließen sich ab dem 13. Tag diagnostizieren, zu Amputationen kam es jedoch nicht.

Überraschenderweise waren bei allen angewandten Infizierungsmethoden auch Mäuse zu beobachten, bei denen es zu keinerlei Krankheitssymptomen kam. Während dies bei den i.p. und nasal infizierten Tieren nur im Einzelfall zu bemerken war, blieben 20 % der über Aerosol infizierten Tiere ohne besondere Symptome.

Bei den Mäusen, die wir oral infiziert hatten, kam es überraschenderweise zu keinen tödlichen Verlaufsformen. Nur bei 3 Tieren, die konzentrierte Virussuspension aufgenommen hatten, bemerkten wir ab dem 11. Tag Schwanzläsionen und Konjunktividen. Die Tiere, denen die Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-5} vorgestellt worden waren, blieben klinisch gesund.

Der Infektionsablauf wurde bei einer Reihe von Tieren serologisch überprüft. Wir faßten sie in 3 Gruppen zusammen: Tiere, die nach 3 min Aerosol-Expositionszeit keine Symptome zeigten bildeten die Gruppe 1, zeigten sie solche, so faßten wir sie in Gruppe 2 zusammen. In eine 3. Gruppe kamen klinisch kranke Tiere nach 10 min Aerosol-Applikation; Tiere, die nicht erkrankten konnten aus technischen Gründen serologisch nicht untersucht werden. In den HAH-Reaktionen konnten 20 Tage p.i. (Versuchsende) folgende HAH-Antikörpertiter festgestellt werden:

Gruppe 1 Titer 1 : 4

Gruppe 2 Titer 1 : 16

Gruppe 3 Titer 1 : 8

Das Ergebnis der Gruppe 1 läßt zugleich eine stille Durchseuchung der Tiere vermuten.

Nach oraler Infektion kam es nur bei der Gruppe zur Bildung von HAH-Antikörpern mit einem Titer von 1 : 8, die das Virus konzentriert erhalten hatte.

Den zeitlichen Ablauf der Infektion in Abhängigkeit von der Applikationsart zeigt Tabelle IV.

Tabelle IV: Gegenüberstellung der Absterberaten bei verschiedenen Infektionsmodi mit virulentem Ektromelievirus

Titer: $10^{5,75}$ KID₅₀/ml

Applikationsmodus, Dosis, je 10 Tiere/Gruppe	Tage post infektionem gestorben														tot/ gesamt
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
i.p. 0,1 ml/Tier 1 : 10 ⁻² verd.	0	1	3	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	8/10	
nasal 0,03 ml/ Tier, konz.	0	0	0	0	1	0	0	0	1	4 ⁺	0	0	0	6/10	
Aerosol 3,0 ml für 10 Tiere 3 min; konz.	0	0	0	0	1	0	4	0	0	2 ⁺	0	0	0	7/10	
Aerosol 5,0 ml für 10 Tiere 10 min, konz.	0	0	0	0	5	0	2	0	0	0	0	0	0	7/10	
Tränke je Tier ca. 1 ml konz.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10	

⁺ 2 moribunde Tiere getötet für Virusnachweis

Um über die Aufnahme des virulenten Ektromelievirus nach Aerosol-Applikation und seine Verbreitung im Organismus der Maus Aufschluß zu erhalten, verimpften wir zu verschiedenen Zeiten post infectionem entnommene Organproben nach entsprechender Aufbereitung auf die CAM bebrüteter Hühnereier. Die Ergebnisse belegen, daß bei der angewandten Technik virulentes Virus bis in die Lungen gelangt. Die Resultate sind in Tabelle V zusammengefaßt.

Tabelle V: Virusnachweis in Organ- und Blutverreibungen nach aerogener Ektromelie-Infektion von Mäusen

Testmaterial	Probeentnahme post inf.	Applikationsmodus; Dosierung	Ergebnis
Lunge	30 min	Aerosol 3 min 3,0 ml/10 Tiere	positiv
	30 min	Aerosol 10 min 5,0 ml/10 Tiere	positiv
	14 Tage	Aerosol 3 min 2,5 ml/10 Tiere	positiv
	14 Tage	nasal 0,03 ml je Tier	positiv
Blut	30 min	Aerosol 3 min 2,5 ml/10 Tiere	negativ
	30 min	Aerosol 10 min 4,0 ml/10 Tiere	negativ
Leber ⁺	10 Tage	i.p. 0,1 ml 10 ^{2,75} KID ₅₀	positiv

⁺ Vergleichsbefund nach i.p. Infektion

5.2.4. Ergebnisse des 1. Vorversuches

Durch den Versuch (vergleiche 5.1.13.) sollte vorgeklärt werden, ob Mäuse nach einer Aerosol-Behandlung mit Vacciniavirus-Suspension eine Immunantwort zeigen und gegen eine Ektromelie-Testinfektion geschützt sind. Außerdem interessierte uns, wie ein Vergleich zur nasalen und i.p. Immunisierung ausfällt.

Um zu wissen, ob durch das Aerosol tatsächlich Vaccinia-Impfvirus in die Lungen gelangt, verimpften wir Verreibungen von Blut und Lunge derart behandelte Tiere auf die CAM bebrüteter Hühnereier. Wir entnahmen die Lungen unter sterilen Kautelen, um eine Kontamination über das Fell auszuschließen, entweder sofort nach einer 5 minütigen Aerosol-Exposition, oder aber erst 30 Minuten nach einer 5 bzw. 10 minütigen Aerosol-Applikation.

Bei den sofort nach der 5 minütigen Expositionszeit gewonnenen Lungen konnte Vacciniavirus auf der CAM nachgewiesen werden, nicht dagegen bei den Lungen- und Blutproben 30 Minuten p.vacc.

35 bzw. 51 Tage nach der ersten Immunisierung entnahmen wir von allen Tiergruppen stichprobenweise Blutproben und setzten danach die Challenge-Infektion i.p. mit 10^2 LD₅₀ virulentem Ektromelievirus.

Es zeigte sich, daß die 1 oder 2-malige Aerosol-Applikation und die nasale Vakzination einen weit geringeren Infektionsschutz vermitteln, als die i.p. Immunisierung. Die über den Respirationstrakt vakzinierten Mäusegruppen wiesen jedoch unter sich nur wenig unterschiedliche

Schutzraten gegen die Testinfektion auf. Merkwürdigerweise ließ sich nur bei der 2 mal mit Aerosol behandelten Gruppe eine humorale Antikörperbildung feststellen, nicht dagegen bei den anderen Tiergruppen.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle VI zusammengefaßt.

Tabelle VI: Ausgang des 1. Vorversuches: Immunisierung mit Vacciniavirus-Stamm CVA (10^7 KID₅₀/ml) durch verschiedene Impfstoffapplikations-Methoden; Belastungsinfektion mit 10^2 LD₅₀ je Tier virulentem Ektromelievirus i.p.

Zahl d. Tiere/ Applikations- modus, Dosie- rung	Chal- lenge- Inf.n. Tagen	HAH- Titer 1 :	Tage p.inf. verendet											tot/ ges.	Über- lebens- rate
			10	11	12	13	14	15	16	17	18	19			
35/1. x Aero- ⁺ sol, 10 min	35	Ø	7	0	2	1	2	0	3	1	0	0	16/ 35	54 %	
35/2 x Aero- ⁺ sol, 10 min 8täg. Abst.	35	16	8	2	1	1	0	0	0	1	1	1	15/ 35	57 %	
20/2 x nasal 0,03 ml, 8- täg. Abst.	35	Ø	3	2	1	1	2	0	0	0	0	0	9/ 20	55 %	
20/i.p. 0,1 ml	35	Ø	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/ 20	100 %	
4/1 x Aero- ⁺ sol, 10 min	51	Ø	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2/ 4	50 %	
3/1 x Aero- ⁺ sol, 5 min	51	Ø	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1/ 3	66 %	
9/Kontrollen	35	Ø	0	3	0	0	1	0	1	0	0	0	5/ 9	44 %	

⁺ = Impfstoffdosierung pro Aerosol-Applikation
ca. 2 ml für 10 Tiere in 10 min, bzw.
ca. 1,5 ml in 5min

Bei einem Teil der immunisierten Tiere, die die Challenge-Infektion überstanden oder erst nach dem 12. Tag p.i. starben, kam es zu Krankheitssymptomen in Form von Mumpsgesicht, Extremitätenschwellungen, Schwanzläsionen und Amputationen. Diese Symptome waren bei den i.p. immunisierten Tieren eindeutig am wenigsten zu sehen. Auch kam es hier zu keinen Todesfällen. Bei den übrigen Tiergruppen waren sicher erfaßbare Unterschiede in der Heftigkeit und in der Anzahl der Leitsymptome nicht erkennbar, wenn man auch den Eindruck gewinnen konnte, daß die nasal immunisierten Tiere besser geschützt waren als die ein Mal bzw. zwei Mal über Aerosol vakzinieren Tiere. Bei letzteren schien der Krankheitsverlauf schwerer zu sein; es kam hier zu zahlreicheren Amputationen als bei den anderen Gruppen. Die nicht geimpften Kontrollen zeigten überraschenderweise einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie die mit Aerosol behandelten Tiere.

Wir schlossen aus dem Versuchsergebnis, daß das verwendete Impfvirus in der applizierten Dosis nur schwach immunisierende Wirkungen entfaltete. Allein die i.p. vakzinieren Tiere erlagen der Testinfektion nicht, doch kam es auch hier noch zu Impfdurchbrüchen. Die niedrig gewählte Challenge-Infektionsdosis ließ gerade noch Unterschiede im Immunstatus der verschiedenen Gruppen erkennen. Insofern hatte der Vorversuch voll die damit beabsichtigten Orientierungshilfen geleistet.

5.2.5. Ergebnisse des zweiten Vorversuches:

Überprüfung des Attenuierungsgrades des Ektromelie-Virusstammes "Hampstead"

Der zweite Vorversuch diente zum Nachweis eventuell noch vorhandener virulenter Eigenschaften des Ektromelie-Vi-

russtammes "Hampstead" (Technik siehe 5.1.13.)

Während der 23-tägigen Beobachtungszeit traten weder bei den i.p., noch bei den Aerosol-infizierten Mäusen Todesfälle auf. Es konnten auch keine Krankheitszeichen festgestellt werden. Lediglich bei einem Tier, das mit $10^{2,5} \text{KID}_{50}$ infiziert worden war, fanden sich am 22. Tag p.i. leichte Schwanzläsionen. Im Gegensatz dazu steht der Befund der histologischen Untersuchung der Lungen nach Aerosol-Applikation, hier fanden sich pneumonische Veränderungen (vgl. 5.1.10.).

Die Verimpfung des Ektromelie-Virusstammes "Hampstead" auf die CAM bebrüteter Hühnereier resultierte in der Bildung proliferativer Veränderungen, die von denen des virulenten Ektromelie-Virusstammes "Düsseldorf E2" nicht zu unterscheiden waren. Anzeichen einer Generalisation waren am 5. Tag p.i. unter den Versuchsbedingungen (Inokulation von $10^{3,5}$ bzw. $10^{2,5} \text{KID}_{50}$; 35°C Bebrütungstemperatur) nicht festzustellen.

5.2.6. Ergebnisse des Hauptversuches

Im Hauptversuch setzten wir neben dem hochattenuierten Vacciniavirus-Stamm CVA auch den Vacciniavirus-Stamm CVB ein, da wie der Vorversuch gezeigt hatte, die durch den Stamm CVA zu erzielende Immunität die Tiere gegen eine Testinfektion nicht ausreichend gut schützte. Andererseits schien uns der positive HAI-Antikörpertiter nach zweimaliger Aerosolbehandlung doch ein wichtiger Hinweis zu sein für eine über den Respirationstrakt zu erreichende immunogene Wirksamkeit des Vacciniavirus. In gleiche Richtung wiesen auch die im Verhältnis zur Kontrollinfektion höheren Überlebensraten bei allen

Aerosol- und nasal behandelten Tieren.

Um exaktere Vergleiche im Immunisierungsvermögen der eingesetzten Impfviren anstellen zu können, wurden bestimmte Tiergruppen mit möglichst gleichen Virusmengen der verschiedenen Impfstoffe infiziert. Deshalb mußte bei einem Teil der Versuche der Virusgehalt des CVA- und des CVB-Stammes demjenigen des Ektromelie-Stammes "Hampstead" angeglichen werden.

Um die bei den Kontrollmäusen des 1. Vorversuches nicht zu 100 % tödlich wirkende Dosis der Ektromelie-Testinfektion zu überprüfen, setzten wir zusätzlich zwei Tiergruppen an. Sie wurden mit 10^3 und $10^4 LD_{50}$ infiziert. In der letzten Gruppe starben alle 15 eingesetzten Mäuse, von den mit $10^3 LD_{50}$ infizierten 14 von 15 Probanden, die überlebende Maus zeigte Krankheitssymptome: Schwanzläsionen und aufgetriebene Hinterextremitäten. Dies weist in Verbindung mit den Befunden bei der Kontrollgruppe (des Hauptversuches), die mit $10^2 LD_{50}$ infiziert wurde und von der 75 % der Tiere starben und alle anderen darauf hin erkrankten, daß die von uns verwendete Challenge-Infektionsdosis eine hohe Morbiditätsrate in einem Bestand erzeugen kann und damit einer natürlichen Ektromelie-Infektion ähnelt. In höherer Dosierung wirkt sie jedoch für alle Tiere einer Versuchsgruppe tödlich.

Der Ausgang des Hauptversuches läßt vier verschiedene Fakten erkennen: 1. Durch eine Aerosolvakzinierung mit einem geeigneten heterologen Orthopoxvirus oder mit einem attenuierten homologen Mäusepockenvirus läßt sich ein belastbarer Infektionsschutz gegen eine Ektro-

melie-Infektion erzielen. 2. Die immunisierenden Eigenschaften des Vacciniavirus-Stammes CVB und des attenuierten Ektromelie-Virusstammes "Hampstead" waren denen des hochpassierten, attenuierten Vacciniavirus-Stammes CVA überlegen. 3. Die nasale Vakzinierung scheint der Aerosol-Vakzinierung gleichwertig zu sein. 4. Bei Verwendung eines schwach immunisierenden Vacciniavirus-Stammes induziert die i.p. Vakzinierung einen viel besseren Infektionsschutz als andere Impfmethoden.

Darüber hinaus können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden: Die schlechten Immunisierungsergebnisse des 1. Vorversuches, wo der attenuierte Vacciniavirus-Stamm CVA verwendet wurde, werden durch den Hauptversuch bestätigt. Dies gilt für alle angewandten Impfverfahren. So erhielten wir bei zweimaliger nasaler Instillation von je 0,03 ml ($10^{5,47} \text{KID}_{50}$) CVA-Virus nur eine Überlebensrate von 11 % gegenüber 100 % beim Vacciniavirus-Stamm CVB unter Verwendung gleicher Virusmengen. Auch bei der Immunisierung über Aerosole waren eindeutige Unterschiede festzustellen. So schützten die ein- und die zweimalige Aerosol-Applikation des CVB-Virus jeweils alle Tiere, während bei gleicher Dosierung der Vacciniavirus-Stamm CVA nur eine Überlebensrate von 20 bzw. 10 % bewirkte. Selbst die i.p. Immunisierung mit CVA-Virus konnte nur eine Überlebensrate von 75 % gegenüber 100 % beim CVB-Virus erzeugen, vorausgesetzt es kamen Impfstoffdosen mit gleichem Virusgehalt von 10^6KID_{50} zur Anwendung.

Der Ektromelie-Virusstamm "Hampstead" enthielt in konzentrierter Form $10^{5,5} \text{KID}_{50}/\text{ml}$, also gegenüber den ebenfalls in konzentrierter Form verimpften Vacciniavirus-

Stämmen CVA und CVB einen wesentlich niedrigeren Virusgehalt.

Von den i.p. mit $10^{4,5}$ KID₅₀ immunisierten Tieren starben bereits am 6. und 7. Tag p.vacc. 3 Tiere. Die Sektion erbrachte den typischen Befund einer Ektromelie-Erkrankung: Exsudat in Brust- und Bauchhöhle. Ab dem 12. Tag traten bei ca. 50 % der Impflinge Schwanzläsionen auf, die jedoch binnen weniger Tage wieder verschwanden. Dies zeigt, daß die Attenuierung des Ektromelie-Virusstammes "Hampstead" noch nicht vollkommen ist. Er besitzt noch eine Restvirulenz, die insbesondere anscheinend nur nach i.p. Applikation zum Vorschein kommt, denn die nasale- und die Aerosol-Vakzination wurden symptomlos vertragen.

Die Challenge-Infektion der mit dem Ektromelie-Virusstamm "Hampstead" immunisierten Tiere erbrachte unabhängig vom Immunisierungsmodus eine 100 %ige Überlebensrate. Impfdurchbrüche waren dabei nicht zu beobachten, was auf einen guten und belastbaren Infektionsschutz schließen läßt. Die immunisierenden Eigenschaften der beiden Vacciniavirus-Stämme fallen bei gleicher Dosierung dem gegenüber ab, wobei wiederum klar die bessere immunogene Wirkung des CVB-Stammes gegenüber dem CVA-Stamm auffällt: Während nach einmaliger Aerosol-Vakzination mit CVB-Virus eine 55 %ige und nach zweimaliger eine 65 %ige Überlebensrate feststellbar waren, sind die entsprechenden Vergleichszahlen des Vacciniavirus-Stammes CVA 26 % bzw. 14 % und damit ähnlich der Zahl überlebender ungeimpfter Kontrolltiere.

Einen weiteren Vergleich zwischen dem Ektromelie-Virusstamm

"Hampstead" und dem Vacciniavirus-Stamm CVB bietet die nasale Immunisierung mit vergleichbaren Virusdosen, wobei beim "Hampstead"-Stamm eine Schutzrate von 100 % und beim CVB-Stamm eine solche von 90 % beobachtet werden konnten. Sehr deutliche Unterschiede in der Wirksamkeit der drei Impfstoffe läßt auch die i.p. Immunisierungsmethode erkennen: Von den mit $10^{4,5} \text{KID}_{50}$ des Ektromelie-Virusstammes "Hampstead" immunisierten Tieren überstanden alle die Testinfektion, von den mit $10^{4,0} \text{KID}_{50}$ CVB-Virus i.p. geimpften 65% und bei den mit $10^{4,8} \text{KID}_{50}$ CVA behandelten Tieren war gar keine Schutzwirkung zu erkennen.

Die Ergebnisse der HAH-Reaktion mit Seren der immunisierten Tiere bestätigten weitgehend den Ausgang des Challenge-Versuches. In den Seren der mit dem Vacciniavirus-Stamm CVA immunisierten Mäuse konnten keine HAH-Antikörper nachgewiesen werden. Sie zeigten auch den schlechtesten Immunstatus. Sowohl bei den mit Vacciniavirus-Stamm CVB geimpften Tieren als auch bei denen, die mit Ektromelie-Virusstamm "Hampstead" immunisiert wurden, konnten wir in der Regel diese Antikörper bei genügend hoher Impfstoffdosierung nachweisen, wobei sich anscheinend eine zweimalige Impfstoffapplikation als vorteilhafter als eine einmalige herausstellte, selbst, wenn die Einzeldosis größer war. Bei letzteren stiegen die Titer nach nasaler und nach ein- bzw. zweimaliger Aerosol-Applikation auf 1 : 16. Bei den i.p. immunisierten Tieren waren dagegen solche Antikörper nicht nachweisbar.

Die entsprechenden Daten können der Tabelle VII Seite 58 entnommen werden.

Tabelle VII : Ergebnis der Immunisierung mit den Vaccinia-virus-Stämmen CVA und CVB, sowie mit dem Ektromelie-Virusstamm "Hampstead" durch verschiedene Impfstoff-Applikationsmethoden. Belastungsinfektion: $10^{2,50}$ LD₅₀ i.p. pro Tier mit virulentem Ektromelie-Virusstamm "Düsseldorf" 35 Tage nach 1. Vakzination.

Zahl der Tiere	Applikationsart, Impfstoff	Dosis (KID ₅₀ pro Tier) Expositionszeit	HAH-Titer 1:	tot / gesamt	Überlebensrate in %
20	nasal CVB	$10^{5,47}$ 2x 8täg. Abst.	32	0/20	100
18	Aerosol CVB	$10^{7,3}$ f. 10 Tiere 10min	8	0/18	100
20	Aerosol CVB	$10^{7,3}$ f. 10 Tiere 10min 2x 8täg. Abst.	16	0/20	100
16	i.p. CVB	10^6	16	0/16	100
20	i.p. CVB	10^4	Ø	7/20	65
19	nasal CVA	$10^{5,47}$ 2x 8täg. Abst.	Ø	17/19	11
20	Aerosol CVA	$10^{7,3}$ f. 10 Tiere 10min	Ø	16/20	20
20	Aerosol CVA	$10^{7,3}$ f. 10 Tiere 10min 2x 8täg. Abst.	Ø	18/20	10
20	i.p. CVA	10^6	Ø	5/20	75
19	i.p. CVA	10^4	Ø	17/19	11
20	nasal Ektromelie "Hamp"	$10^{3,97}$ 2x 8täg. Abst.	16	0/20	100
18	Aerosol Ektromelie "Hamp"	$10^{5,8}$ f. 10 Tiere 10min	16	0/18	100
20	Aerosol Ektromelie "Hamp"	$10^{5,8}$ f. 10 Tiere 10min 2x 8täg. Abst.	16	0/20	100
17	i.p. Ektromelie "Hamp"	$10^{4,5}$	Ø	0/17	100
20	nasal CVB	$10^{3,97}$ 2x 8täg. Abst.	Ø	2/20	90
20	Aerosol CVB	$10^{5,8}$ f. 10 Tiere 10min	Ø	11/20	55
20	Aerosol CVB	$10^{5,8}$ f. 10 Tiere 10min 2x 8täg. Abst.	16	7/20	65
15	Aerosol CVA	$10^{5,8}$ f. 10 Tiere 10min	Ø	11/15	26
15	Aerosol CVA	$10^{5,8}$ f. 10 Tiere 10min 2x 8täg. Abst.	Ø	13/15	14
20	Kontrolle		Ø	15/20	25

6. Besprechung der Ergebnisse

Die Immunisierung von Tierbeständen durch Applikation von Impfstoff-Aerosolen (auch Spray-Vakzination genannt) findet in jüngster Zeit immer größeres Interesse. Gegen die Staupe der Nerze und die Panleukopenie der Katze hat sich die Spray-Vakzination unter Praxisbedingungen bereits als wirksam erwiesen (ACKERMANN 1966, SCOTT und GLANBERG 1975). Gegen eine Reihe anderer, vorwiegend respiratorischer Viruserkrankungen der Tiere, wie auch des Menschen befinden sich nasale Impfungen und Spray- bzw. Aerosol-Vakzinationen noch in der Erprobung bzw. im Stadium des Experimentes (BABKIN et al. 1974, GOUGH und ALLAN 1974, LAPIERRE et al. 1975, MUNZ et al. 1974b, NEUMANN et al. 1974, PETTE et al. 1964, SELIVANOV und KHASANOV 1974, SCHULZE-REHM et al. 1974, STRAUB et al. 1973). Zielvorstellungen sind dabei einmal die Suche nach rationellen Immunisierungsmethoden, die nur einen geringen Aufwand an Zeit, Material und an Arbeitskraft erfordern, für Massensimpfungen deshalb geeignet sind und keine Streßbelastung für die Impflinge bedeuten. Andererseits wollte man den Respirationstrakt als primären Ort der Virus-Wirt-Auseinandersetzung benutzen, um dadurch die gleichen Abwehrmechanismen auszulösen, die in der Regel bei natürlichen Infektionen der genannten Art in Gang kommen. Man verband mit diesen Vorstellungen die Hoffnung, einen effektiveren oder auch risikoreicheren Impfschutz als mit den üblichen parenteralen Immunisierungsmethoden zu erreichen.

Derzeit wird gegen infektiöse Ektromelie der Mäuse die intraperitoneale Applikation von Vacciniavirus eingesetzt. Dieses Impfverfahren bewirkt eine gute Immunität (ZELLER und RECKZEH 1965), jedoch erfordert die Vakzinierung jedes einzelnen Tieres in großen Mäusekollektiven einen hohen Arbeitsaufwand. Versuche,

diese Methode durch eine Trinkwasser-Vakzinierung mit dem hoch attenuierten Vacciniavirus-Stamm CVA und dem nicht attenuierten Vacciniavirus-Stamm CVB abzulösen, deckten nur deren prinzipielle Möglichkeit auf, verliefen jedoch insgesamt wenig befriedigend, weil es nur unter bestimmten Voraussetzungen zur Aufnahme genügend großer und ausreichend wirksamer Impfvirusdosen kam (MUNZ et al. 1974a).

Ziel unserer Untersuchungen war es, zu erproben, ob Mäuse durch Applikation eines Impfstoff-Aerosols gegen die infektiöse Ektromelie immunisiert werden können, wobei sowohl attenuiertes (Stamm CVA), als auch nicht attenuiertes Vacciniavirus (Stamm CVB) und attenuiertes Ektromelievirus (Stamm "Hampstead") vergleichend getestet werden sollten.

Die Einsatzmöglichkeit eines Impfstoffes setzt primär seine Unschädlichkeit für den Impfling voraus. Hierbei können Unterschiede in Abhängigkeit vom Applikationsmodus auftreten. Diese Fakten waren für die Vacciniavirus-Stämme CVA und CVB bekannt: Sie können ohne Schädigung i.p., nasal, peroral, s.c. und i.m. appliziert werden (HOCHSTEIN-MINTZEL et al. 1972, MUNZ et al. 1974a). Wir bemerkten auch nach ihrer aerogenen Applikation keine nachteilige Wirkung. Auf die außergewöhnlich gute Verträglichkeit des Vacciniavirus-Stammes CVA auch für den Menschen, sowie für Affen, Kaninchen, Ferkel und Hunde machten MAYR et al. (1975) aufmerksam.

Entsprechende Tests mit dem im Rahmen unserer Untersuchungen auf seine Eignung als Impfstoff zu prüfenden attenuierten Ektromelievirus-Stamm "Hampstead" ließen erkennen, daß er noch eine Restvirulenz besitzt: Nach i.p. Applikation von $10^{4,5} \text{KID}_{50}$ (Immunisierung der Tiere für den Hauptversuch) starben 3 von 20 Mäusen, 10 Tiere zeigten typische Krankheitssymptome der Ektromelie. Schon im Vorversuch hatten wir bemerkt, daß nach seiner Applikation als Aerosol die Tiere zwar klinisch

unauffällig blieben, histologisch jedoch pneumonische Veränderungen der Lungen mit Nekrosen und Gefäßthrombosen nachweisbar waren. Anscheinend ist die i.p. Infektion die empfindlichste Methode, eine Restvirulenz bzw. eine noch unvollständige Attenuierung eines Ektromelievirus-Stammes bei der Maus aufzuzeigen.

Eine weitere Vorbedingung für eine Aerosol-Vakzination ist, daß das Antigen über Flüssigkeitströpfchen geeigneter Größe die Rezeptoren möglichst des gesamten Atemtraktes erreicht. Die Überprüfung der von uns verwendeten Apparatur (Sauerstoff-Aerosol-Gerät "OXYPARAT") durch Vernebelung von Tusche ergab, daß Tuschepartikel bis in die Alveolen gelangten. Wir konnten deshalb davon ausgehen, daß versprühtes Impfvirus in gleicher Weise über die Schleimhaut des Atemweges verbreitet wird.

Wie schon die Versuche von MUNZ et al. (1974a+b) zur Immunisierung gegen infektiöse Ektromelie der Mäuse und zur Aerosol-Vakzinierung von Kanarienvögeln gegen Kanarienspocken gezeigt hatten, kommt der Beurteilung des Immunisierungserfolges durch den Challenge-Versuch, der auch geringe Immunitätsunterschiede erkennen lassen sollte, eine entscheidende Bedeutung zu. Der von uns dazu verwendete virulente Ektromelievirus-Stamm "Düsseldorf E2" hat sich in unseren Versuchen als geeignet erwiesen. Die Bestimmung der LD_{50} -Dosen war in ca. 5 Wochen alten Tieren vorgenommen worden. Zur Durchführung der Challenge-Versuche im Vor- und Hauptversuch benutzten wir eine Dosis von 10^2 LD_{50} /Tier. Dieser erlagen jedoch nur noch 56 % bzw. 75 % der nunmehr 10 Wochen alten Kontrolltiere, obwohl sie ausnahmslos typisch erkrankten. Wir führen diese Unterschiede auf die Altersdifferenz zurück: Die alten Tiere waren gegen die Infektion resistenter. Es ließen sich jedoch dafür geringe Immunitätsunterschiede bei den geimpften Tieren erkennen

und Impfdurchbrüche durch eine zu hohe Belastungsdosis vermeiden. Für die Untersuchungen wurden nur weibliche Tiere verwendet, um einheitlichere Versuchsergebnisse durch Ausschaltung der durch Beißereien etc. bei männlichen Tieren zu beobachtenden Verletzungen und unspezifischen Todesfälle zu vermeiden. Wir nahmen deshalb bewußt die geringere Empfänglichkeit weiblicher Tiere gegenüber einer Ektromelie-Infektion in Kauf.

Zur oralen Immunisierung mit Vacciniavirus gegen Ektromelie sind mindestens $3 \times 10^{7,5} \text{KID}_{50}$ des Vacciniavirus-Stammes CVA, zur i.p. Vakzinierung $10^{6,5} \text{KID}_{50}$ nötig (MUNZ et al. 1974a). Für unsere Versuche kamen die Vacciniavirus-Stämme CVA und CVB mit je einem Virusgehalt von $10^{7,0} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ zur Anwendung. Das attenuierte Ektromelievirus wies demgegenüber nur $10^{5,5} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ auf. Um auch gleiche Virusdosen miteinander vergleichen zu können, wurden für einen Teil des Hauptversuches die höhertitrigen Vacciniavirus-Impfstoffe CVA und CVB auf den Titer des attenuierten Ektromelievirus-Stammes eingestellt.

Schon im Vorversuch trat eine von der Applikationsart abhängige, meist schlechte immunisierende Wirkung des Vacciniavirus-Stammes CVA zu Tage. Weder mit Aerosol, noch mit der nasalen Applikation konnte ein guter Schutz erzielt werden. Er befriedigte nur nach i.p. Immunisierung. Auch im Hauptversuch schnitt dieser Virusstamm im Vergleich zum Vacciniavirus-Stamm CVB und zum Ektromelievirus-Stamm "Hampstead" am schlechtesten ab. So überlebten nach Aerosol-Impfung maximal 20 % der Tiere, nach nasaler Impfstoff-Applikation 11 % und nach i.p. Immunisierung 75 %. Damit wurde die von MUNZ et al. (1974a) schon beschriebene schlechte Antigenität dieses hoch attenuierten Virusstammes genau so bestätigt, wie der Befund, daß eine i.p. Impfung mit diesem Stamm bei genügend hoher Dosierung noch eine be-

friedigende bis gute Immunität verleihen kann.

Dieser Nachweis einer schwachen immunogenen Wirkung des Vacciniavirus-Stammes CVA trifft auch für seine Applikation am Menschen zu. Bei kutaner Verimpfung kommt es nicht mehr zu einer Lokalreaktion mit Immunitätsbildung wie bei einer üblichen Pockenschutzimpfung. Eine intrakutane Applikation bewirkt zwar eine lokale Rötung und Infiltration, serologisch nachweisbare Antikörper treten jedoch nicht auf. Trotzdem verläuft eine Nachimpfung wie eine gefahrlose Wiederimpfung. Diese Möglichkeit, gegen Variola mit einem wesentlich herabgesetzten Impfrisiko vakzinieren zu können, wurde in einem Großversuch geprüft (STICKL 1974). Unsere Ergebnisse weisen zusätzlich darauf hin, daß der alleinigen Verwendung von hoch attenuierten Orthopoxviren als Impfstoffe praktische Grenzen gesetzt sind.

Die Ergebnisse des Hauptversuches lassen aber auch die prinzipielle Möglichkeit erkennen, daß Mäuse durch eine Aerosol-Impfung dann erfolgreich gegen eine Mäusepocken-Infektion geschützt werden können, wenn ein ausreichend immunogen wirksamer Vacciniavirus-Stamm, wie z.B. der Stamm CVB verwendet wird. Zum attenuierten Ektromelievirus-Stamm "Hampstead" ließen sich hierbei zwischen einmaliger und zweimaliger Vakzinierung keine Unterschiede feststellen. Voraussetzung dafür war, daß der Stamm CVB wenigstens $10^{7,0} \text{ KID}_{50}/\text{ml}$ enthielt. In einer niedrigeren, dem attenuierten Ektromelievirus-Stamm "Hampstead" entsprechenden Dosierung, kam es zu einem deutlich verringerten Impferfolg.

Zur erfolgreichen Aerosol-Vakzinierung mit dem CVB-Stamm gegen Mäusepocken ist deshalb wenigstens eine 100-fach höhere Impfstoffkonzentration notwendig als bei Verwendung des attenuierten Ektromelievirus-Stammes "Hampstead".

Die nasale Applikation erwies sich in unseren Versu-

chen als gleichwertig der Aerosol-Behandlung bzw. einer i.p. Immunisierung, wenn beim Vacciniavirus CVB $10^{5,47} \text{KID}_{50}$ und beim Ektromelievirus-Stamm "Hampstead" $10^{5,97} \text{KID}_{50}$ zwei Mal im Abstand von acht Tagen appliziert wurden. Einen 100 %igen Infektionsschutz hatten wir beim Stamm CVB nach Applikation von wenigstens $10^{7,3} \text{KID}_{50}$ für 10 Tiere als Aerosol erzielt. Beim Ektromelievirus-Stamm "Hampstead" genügten $10^{5,8} \text{KID}_{50}$ für 10 Tiere. Mäuse, denen wir vom Stamm CVB 10^6KID_{50} i.p. verimpften und Tiere, die die Immunisierung mit $10^{4,5} \text{KID}_{50}$ des Ektromelievirus-Stammes "Hampstead" überlebt hatten, waren gegen die Challenge-Infektion völlig geschützt. 10^6KID_{50} des Vacciniavirusstammes CVA ließen jedoch nach i.p. Applikation nur eine 75 %ige Überlebensrate erkennen.

Hämagglutinationshemmende-(HAH)-Antikörper konnten bei unseren immunisierten Tieren vor der Challenge-Infektion dann in der Regel nachgewiesen werden, wenn sie den Vacciniavirus-Stamm CVB und den Ektromelievirus-Stamm "Hampstead" nasal, i.p. oder als Aerosol in einer Dosierung erhalten hatten, die gegen eine Belastungsinfektion schützte. Allgemein kann deshalb gesagt werden, daß beim Nachweis von HAH-Antikörpern auch ein guter Infektionsschutz vorlag. Der Vacciniavirus-Stamm CVA ließ dagegen keine humorale Immunantwort erkennen. Das Fehlen der HAH-Antikörper im Serum war jedoch nicht generell auch mit einem Ausfall des Immunschutzes verbunden.

Die Frage, welche Impfmethode und welche Impfstoffe zur Immunisierung gegen Mäusepocken angewandt werden sollen, möchten wir auf Grund unserer Versuchsergebnisse wie folgt beantworten: Zur Immunisierung kleiner Bestände dürfte vorerst noch die i.p. Immunisierung vorzuziehen sein, weil sie ohne Verwendung einer speziellen Apparatur einen guten Impfschutz verleiht. Der-

zeit noch bestehende technische Schwierigkeiten bei der Anwendung der Aerosol-Vakzinierung unter Praxisbedingungen lassen sich sicherlich durch den Einsatz genügend großer Aerosolgeräte, abgedichteter Immunisierungskammern etc. überwinden. Das Problem liegt vielmehr darin, welches Orthopoxvirus gefahrlos für Mensch und Tier versprüht werden kann. Im Hinblick auf die abnehmende Pocken-Immunität der Bevölkerung birgt die Anwendung von Vacciniavirus-Impfstoffen über Aerosol gewisse Gefahren, die größer einzuschätzen sind als die bei i.p. Applikation derartiger Vakzinen. Diese Risiken dürften bei Verwendung von genügend attenuiertem Ektromelievirus nicht im gleichen Ausmaß bestehen. Der von uns verwendete Ektromelievirus-Stamm "Hampstead" war noch geringgradig virulent für Mäuse. Weitere Untersuchungen sollten prüfen, ob dieser Stamm unter Erhalt seiner immunogenen Eigenschaften weiter attenuiert und gefahrlos als Impfstoff eingesetzt werden kann.

In Übereinstimmung mit den Befunden zur nicht-parenteralen Immunisierung gegen Kanarienvpocken (MUNZ et al. 1974b) und zur oralen Immunisierung gegen Mäusepocken (MUNZ et al. 1974a) weisen die Ergebnisse darauf hin, daß zur nicht-parenteralen Immunisierung gegen tierische Pockeninfektionen dem Respirationstrakt besondere Bedeutung zukommt.

7. Zusammenfassung

Mit dem hochattenuierten Vacciniavirus-Stamm "Ankara" (CVA), dem Vacciniavirus-Stamm "Bern" (CVB) und dem attenuierten Ektromelievirus-Stamm "Hampstead" wurden weibliche Mäuse gegen Mäusepocken ein- bzw. zweimal geimpft, um vor allem die Möglichkeit und Wirksamkeit einer Aerosol-Vakzinierung vergleichend mit der üblichen i.p. und der nasalen Immunisierung zu testen. Die Unschädlichkeit der Impfstoffe wurde durch klinische Beobachtung, Sektion und histologische Untersuchung geprüft. Die beiden Vacciniavirus-Stämme erwiesen sich dabei als gut verträglich, während der Ektromelievirus-Stamm "Hampstead" pathologische Veränderungen, nach i.p. Applikation auch noch Todesfälle hervorrief.

Die jeweils erzielte Immunität wurde durch eine i.p. Belastungsinfektion 35 Tage nach der ersten Vakzination mit virulentem Ektromelievirus (Stamm Düsseldorf E2) und durch den Nachweis hämagglutinationshemmender Antikörper vor dieser Challengeinfektion überprüft.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß eine Aerosol-Immunisierung gegen Mäusepocken mit dem Vacciniavirus-Stamm CVB einen vollständigen Schutz gegen eine Belastungsinfektion zu induzieren vermag. Genauso gut schützte eine nasale und i.p. Applikation dieses Impfstoffes.

Die Anwendung des hoch attenuierten Vacciniavirus-Stammes CVA ließ demgegenüber bei allen durchgeführten Applikationsarten nur ungenügende Impferfolge trotz gleicher Dosierung erkennen.

Ektromelievirus vom Stamm "Hampstead" erzeugte selbst in 100 fach geringerer Konzentration bei i.p., nasaler und Aerosol-Applikation einen vollkommenen Schutz gegen die Belastungsinfektion. Seiner allgemeinen Anwendung steht jedoch die noch ungenügende Verträglichkeit entgegen.

Auf Grund der Versuchsergebnisse wird für die Vakzination kleiner Tierbestände die i.p. Impfstoffapplikation noch immer als die Methode der Wahl angesehen. Die prinzipiell mögliche und wirksame Aerosol-Vakzination kann nach Überwindung technischer Probleme und bei Verwendung von für Mensch und Tier gefahrlosen Impfstoffen zur Immunisierung größerer Tierkollektive vor allem Vorteile in arbeitstechnischer Hinsicht bieten.

Summary

Attenuated vaccinia virus, strain "Ankara" (CVA), not attenuated vaccinia virus, strain "Bern" (CVB) and attenuated ectromelia virus, strain "Hampstead" were used to immunize female mice once or twice against infectious ectromelia (mouse pox) in order to evaluate the possibility and efficiency of an aerosol-vaccination in comparison to the usual intraperitoneal and intranasal vaccination technique.

The harmlessness of the vaccines under investigation was proved by clinical observations, by post mortem and histological examinations. Both vaccinia virus strains were well tolerated. In the contrary the ectromelia virus strain "Hampstead" still produced pathological lesions and even deaths after i.p. application.

The induced immunity of the mice was challenged by i.p. infection with virulent ectromelia virus (strain "Düsseldorf E2") 35 days after first vaccination and by demonstration of hemagglutination inhibiting antibodies before the challenge infection.

Complete protection against the challenge infection could be achieved by aerosol vaccination with vaccinia virus strain "Bern" as well as by its intranasal and

i.p. application.

Vaccination with high attenuated vaccinia virus strain "Ankara" produced only an inefficient immunity with no respect to the vaccination technique applied.

Ectromelia virus strain "Hampstead" induced a very strong immunity after aerosol, i.p. and intranasal administration. Complete protection was already achieved by a dosis which was 100 fold lower than those used for vaccination with the vaccinia virus strains.

But due to its unsatisfactory incompatibility the general use of this ectromelia virus strain as a vaccine against mouse pox is not yet possible.

Intraperitoneal administration is still recommended for vaccination of small numbers of mice. Aerosol vaccination seems to be a possible, practicable and an efficient technique for mass vaccination provided some still existing technical problems are solved and vaccines innocent for man and animals available.

8. Literaturverzeichnis

- | | | |
|---|---|------|
| ACKERMANN O. | Bessere Immunisierungsmöglichkeiten bei Nerzen gegen Staupe.
Dtsch. tierärztl. Wschr. <u>73</u> , 11 | 1966 |
| BABKIN V.F.,
PROKOF'EVA M.T.,
NAUMETS Z.P.,
SMOLYANINOV V.K. | Aerosol immunization against infectious laryngotracheitis using an inactivated vaccine.
Veterinarija, Kiev <u>38</u> , 37 | 1974 |
| BARSKI G. | Detection of latent ectromelia virusinfection in mice with the aid of human cell cultures in vitro.
Virology <u>10</u> , 155 | 1960 |
| BAUER D.J. | The chemotherapeutic activity of compounds copper, rhodanum and certain other metals in mice infected with neurovaccinia and ectromelia viruses.
Brit. J. exp. Path. <u>39</u> , 480 | 1958 |
| BAUER D.J.,
SADLER P.W. | Derivates of isatin beta-thiosemicarbazone with antiviral chemotherapeutic activity against ectromelia infection.
Nature, London <u>190</u> , 1167 | 1961 |
| BIRCH-HIRSCHFELD L. | Untersuchungen über Ectromelia infektiosa.
Zbl. Bakt. I. Orig. <u>129</u> , 274 | 1933 |
| BLANDEN R.V. | Mechanisms of recovery from a generalized viral infection : mousepox
III. Regression of infectious foci.
J. exp. Med. <u>133</u> , 1090 | 1971 |
| BLANDEN R.V. | T-Cell Response to Viral and Bacterial Infection.
Transplant. Rev. <u>19</u> , 56 | 1974 |

- FENNER F. Studies in mouse pox (infectious ectromelia of mice) VI. A comparison of the virulence and infectivity of three strains of ectromelia virus.
Austr.J.exp.Biol.Med.Sci. 27, 31 1949b
- FENNER F. Mouse pox (infectious ectromelia of mice) A review.
J.Immunol. 63, 341 1949c
- GERMER W.D.,
DIEFENTHAL W.,
HABERMEHL K.O. Latente Infektion von Mäuse-embryonen mit Ektromelievirus (Mäusepocken) infolge diaplazentarer Übertragung.
Z.f.Hyg. 147, 269 1961
- GLEDHILL A.W. Latent Ectromelia
Nature 196, 298 1962
- GÖNNERT R. Weitere Untersuchungen über die Ektromelie.
Zbl.Bakt.I.Orig. 148, 294 1942
- GOUGH R.E.,
ALLAN W.H. The potential as on aerosol vaccine of Ulster 2C strain of Newcastle disease virus.
Vet.Rec. 95, 263 1974
- GRÖPPEL K.H. Über das Vorkommen von Ektromelie (Mäusepocken) unter Wildmäusen.
Arch.exp.Vet.Med. 16, 243 1962
- GÜTTNER J. Morphologie der postakuten viszerale Ektromelie.
Z.Versuchstierk. 16, 113 1974
- HERRLICH A. Die Pocken
2.Auflage
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1967
- HERRLICH A.,
MAYR A. Die Differenzierung der Tierpockenviren in bebrüteten Hühnereiern.
Arch.Hyg. 139, 444 1955

- HOCHSTEIN-MINTZEL V.
HUBER H.CHR.
STICKL H.
Die orale und nasale Immunisierung mit Poxvirus vaccinia. III.Mitteilung: Tierexperimentelle Untersuchungen.
Zbl.Bakt.Hyg.I.Orig.B. 156, 30 1972
- HORZINEK M.
Titration der hämagglutinationshemmenden Antikörper gegen das Ektromelievirus mittels der Mikromethode nach Takatsy.
Zbl.Bakt.I.Orig. 197, 18 1965a
- HORZINEK M.
Eine einfache Labormethode zur Diagnose der Mäusepocken (Ektromelie).
Z.Versuchstierk. 6, 134 1965b
- HORZINEK M.
Untersuchungen zur Diagnose der Mäusepocken (Ektromelie) mittels Agargel-Präzipitation.
Arch.ges.Virusforsch. 17, 264 1965c
- HORZINEK M.
HÖPKEN W.
Serologische Untersuchungen über die experimentelle Ektromelie der Maus.
Zbl.Bakt.I.Orig. 197, 26 1965a
- HORZINEK M.
HÖPKEN W.
Untersuchung über die inapparente Infektion mit dem Ektromelievirus.
Arch.ges.Virusforsch. 17, 125 1965b
- KÄRBER G.
Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Naunyn Schmiedbergs Arch.exp. Path.Pharmak. 162, 480 1931
- KARASEK E.
Möglichkeiten und Grenzen des fluoreszenz-serologischen Nachweises von Ektromelievirus in Organmaterial.
Z.Versuchstierk. 11, 222 1969
- KARASEK E.
ROHDE W.
Zur Charakterisierung des Ektromelievirus in Zellkulturen.
Arch.ges.Virusforsch. 23, 50 1969

- | | | |
|--|--|------|
| KIKUTH W.,
GÖNNERT R. | Erzeugung von Ektromelie
durch Provokation.
Arch.ges.Virusforsch. <u>1</u> , 295 | 1940 |
| KONOSH O.V. | Prophylactic vaccination
of white mice against
infectious ectromelia.
Probl.Virol. <u>3</u> , 53 | 1958 |
| LAPIERRE N.,
LARIVIÈRE S.,
MARSOLAIS G. | Effect of the age of calves
on a programme of intranasal
vaccination against bovine
Rhino-tracheitis and
Parainfluenza.
Canad.vet.J. <u>16</u> , 71 | 1975 |
| LAWRENCE J.J. | The invasion of the chick
embryo by Ectromelia virus
after inoculation on the
Chorioallantoic membrane.
Austral.J.exp.Biol. <u>35</u> , 179 | 1955 |
| MARCHAL J. | Infectious ectromelia, a
hitherto undescribed virus
disease of mice.
J.Path.Bact. <u>33</u> , 713 | 1930 |
| MATSUBARA T. | Experimental studies on
pathogenesis of infectious
ectromelia.
Sapporo Med.J. <u>15</u> , 41 | 1959 |
| MAYR A. | Experimentelle Arbeiten über
das hämagglutinierende Prinzip
bei den Tierpockenviren.
Arch.ges.Virusforsch. <u>6</u> , 439 | 1956 |
| MAYR A.,
HOCHSTEIN-MINTZEL V.,
STICKL H. | Abstammung, Eigenschaften und
Verwendung des attenuierten
Vaccinia-Stammes MVA.
Infection <u>3</u> , 6 | 1975 |
| MAYR A., MAHNEL H.,
MUNZ E. | Systematisierung und Differen-
zierung der Pockenviren.
Zbl.Vet.Med.B. <u>19</u> , 69 | 1972 |

- MOOSER H. Über die Infektion der weißen Maus mit einem Stamm klassischen Fleckfiebers und dem Virus der infektiösen Ektromelie. Schweiz.Zschr.Path.Bakt. 6, 463 1943
- MUNZ E., REIMANN M.,
HOFFMANN R.,
GOEBEL E. Perorale Immunisierungsversuche mit Vaccinia-Virus gegen Mäusepocken. Zbl.Bakt.Hyg.I.Orig.B. 159, 10 1974a
- MUNZ E., REIMANN M.,
SAILER H. Vergleichende Untersuchungen zur parenteralen und nicht-parenteralen Immunisierung gegen Kanarienvpocken. Zbl.Vet.Med.B. 21, 442 1974b
- NEUMANN W.,
BLINDOW H.,
DIERKS U., REUSS U. Erfahrungsbericht über einen Impfgroßversuch an Kälbern mit Parainfluenza-3-Vakzine im Landkreis Friesland. Tierärztl.Umschau 29, 554 1974
- NÖLLER H.G. Die Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus. Klin.Wschr. 33, 770 1955
- PEARSON A. Attempted control of ectromelia in a mouse-breeding colony. Nature 180, 1300 1957
- PETTE J.,
WIZIGMANN G.,
WEISSER W. Untersuchungen über die Wirksamkeit eines Parainfluenza -3-Lebendimpfstoffes bei Kälbern. Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 77, 273 1964
- POTTER C.W.,
JENNINGS R.,
MCLAREN C.,
CLARKE A. Immune response in volunteers to intranasal inoculation with freeze-dried influenza A/Hong Kong/68 vaccine. J.Biol.Stand. 3, 41 1975
- RÖHRER H. Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren. Band II, Spezieller Teil 1. VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1967

- ROHDE W. Zur Serodagnostik der Ektromelie bei Versuchsmäusen.
Arch.exp.Vet.Med. 24, 655 1970
- ROLLE M.,
MAYR A. Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre.
3. Auflage
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 1966
- SALAMAN M.H. Control of ectromelia in mouse colonies.
Lab. animals bureau collected papers 4, 19 1956
- SALAMAN M.H.
TOMLINSON A.J.H. Vaccination against mouse pox: with a note on the suitability of vaccinated mice for work on chemical introduction of skin tumors.
J.Path.Bact. 74, 17 1957
- SCHELL K. Studies on the innate resistance of mice to infection with mouse pox. I. Resistance and antibody production.
Austr.J.exp.Biol. 33, 271 1960
- SCHIEK W. Die Dichtebestimmung von Viren im Caesiumchlorid-Wasser-Gradienten. Vergleichende Untersuchung des Vakzine- und Ektromelie-Virus.
Zbl.Bakt.Hyg.I.Hyg.I.Orig. 201, 7 1966
- SCHULZE-REHM G.,
MONREAL G.,
KRAFT V. Versuche zur Sprayimmunisierung gegen Newcastle Krankheit.
Zbl.Vet.Med.B. 21, 439 1974
- SCHWANZER V.,
DEERBERG F.,
FORST J.,
LIESS B.,
SCHWANZEROVA I.,
PITTERMANN W. Intrauterine infection of mouse with Ectromelia virus.
Z.Versuchstierk. 17, 110 1975
- SCOTT F.W.,
GLANBERG A.F. Aerosol vaccination against Feline Panleukopenia.
J.Amer.Vet.Med.Ass. 166, 147 1975

- SELIVANOV A.V.,
KHASANOV C.G. Aerosol vaccination of pigs
against Aujeszky's disease in
USSR.
Cahiers de Medicine Vétérinaire
43, no 5, 353 1974
- SOAVE O.A.,
LUND J.E. Appearance and distribution
of ectromelia virus inclusion
bodies in experimentally
infected mice.
Lab. Animal Care 20, 499 1970
- STICKL H.,
HOCHSTEIN-MINTZEL V.,
MAYR A., HUBER H.CH.,
SCHÄFER H., HOLZNER A. MVA-Stufenimpfung gegen Pocken
Dtsch.med.Wschr. 99, 2386 1974
- STRAUB O.C.,
FRERKING H., KRAMER R. Impfung eines großen Rinder-
bestandes gegen Bläschenaus-
schlag und Rhinotracheitis.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 4, 73 1973
- TRENTIN J.J.,
BRIODY B.A. An outbreak of mouse pox
(infectious ectromelia) in
the United States.
II. Definitive Diagnosis.
Science 117, 227 1953
- TRENTIN J.J.,
FERRIGNO M.A. Control of mouse pox (infec-
tious ectromelia) by immunization
with vaccinia virus.
J.Nat.Cancer Inst. 18, 757 1957
- TUFFERY A.A. The laboratory mouse in Great
Britain II. Intercurrent
infection. (Ectromelia)
Vet.Rec. 68, 478 1956
- WESTWOOD J.C.N.,
BOULTER E.A.,
BOWEN E.T.W., MABER H.B. Experimental respiratory infec-
tion with pox viruses.
Brit.J.exp.Pathol. 47, 453 1966
- ZELLER H.,
RECKZEH G. Zur Immunisierung der weißen
Maus gegen Ektromelie mit
aktivem Vaccine-Virus.
I. Mitteilung: Methoden und
Grundlagen.
Zbl.Bakt.I.Orig. 195, 282 1965a

ZELLER H.,
RECKZEH G.

Zur Immunisierung der weißen
Maus gegen Ektromelie mit
aktivem Vaccine-Virus.
II. Mitteilung: Praktische
Erfahrungen.

Zbl.Bakt.I.Orig. 197, 34

1965b

9. Lebenslauf

Am 6.7.1943 wurde ich in Metz-Lothringen als Sohn des Diplom-Ingenieurs Hans Zschekel und seiner Ehefrau Ursula geb. Zebelin geboren. Nach einer fünf-jährigen Grundschulzeit in Frankfurt am Main folgte ein sieben-jähriger Oberschulbesuch in Stuttgart. Dort legte ich nach einer anschließenden Lehrzeit von 3 1/2 Jahren die Facharbeiterprüfung als Elektromechaniker ab. Danach wurde ich für 18 Monate zur Bundeswehr eingezogen. Während der Lehrzeit begann ich mich auf das Abitur für Externe mit Hilfe eines privaten Institutes vorzubereiten. Im Juni 1969 legte ich die Prüfung erfolgreich ab.

Noch im gleichen Jahr nahm ich das Studium der Tiermedizin in München auf. Mit dem Staatsexamen schloß ich dieses im November 1974 ab. Meine Bestallung als Tierarzt erhielt ich am 13. Januar 1975.

Seit Januar 1975 arbeite ich als Doktorand am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Universität München.

Bei Herrn Prof. Dr. J. Boch bedanke ich mich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Für die Übergabe des Themas, die wissenschaftliche Beratung und die freundliche Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung meiner Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. E. Munz.

Mein Dank gilt besonders auch Herrn M. Reimann für seine geduldige Unterweisung in virologischen Techniken und seine bereitwillige Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

